



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Evaluación de tequilas auténticos y destilados de agave mediante la determinación de furfural, 2-acetilfurano y 5-metilfurfural por HPLC y análisis multivariante a partir de datos UV-Vis.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADAS EN QUÍMICA

PRESENTAN:

GUTIÉRREZ VARGAS MARISOL

VEGA MORALES ANA LAURA

ASESORES:

Dra. Ma. Guadalupe Pérez Caballero

Dr. José de Jesús Olmos Espejel

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis.**

Evaluación de tequilas auténticos y destilados de agave mediante la determinación de furfural, 2-acetilfurano y 5-metilfurfural por HPLC y análisis multivariante a partir de datos UV-Vis.

Que presenta la pasante: **Marisol Gutiérrez Vargas**
Con número de cuenta: **414033836** para obtener el Título de: **Licenciada en Química**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 20 de Noviembre de 2020.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	<u>Dra. María Guadalupe Pérez Caballero</u>	
VOCAL	<u>Dra. María Gabriela Vargas Martínez</u>	
SECRETARIO	<u>Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez</u>	
1er. SUPLENTE	<u>M. en C. Pablo Hernández Matamoros</u>	
2do. SUPLENTE	<u>Q. Lidia Elena Ballesteros Hernández</u>	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga*



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: LA. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis.

Evaluación de tequilas auténticos y destilados de agave mediante la determinación de furfural, 2-acetilfurano y 5-metilfurfural por HPLC y análisis multivariante a partir de datos UV-Vis.

Que presenta la pasante: Marisol Gutiérrez Vargas

Con número de cuenta: 414033836 para obtener el Título de: Licenciada en Química

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 20 de Noviembre de 2020.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. María Guadalupe Pérez Caballero	
VOCAL	Dra. María Gabriela Vargas Martínez	
SECRETARIO	Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez	
1er. SUPLENTE	M. en C. Pablo Hernández Matamoros	
2do. SUPLENTE	Q. Lidia Elena Ballesteros Hernández	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga*



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: LA. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis.**

Evaluación de tequilas auténticos y destilados de agave mediante la determinación de furfural, 2-acetilfurano y 5-metilfurfural por HPLC y análisis multivariante a partir de datos UV-Vis.

Que presenta la pasante: **Marisol Gutiérrez Vargas**
Con número de cuenta: **414033836** para obtener el Título de: **Licenciada en Química**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 20 de Noviembre de 2020.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. María Guadalupe Pérez Caballero	_____
VOCAL	Dra. María Gabriela Vargas Martínez	_____
SECRETARIO	Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez	
1er. SUPLENTE	M. en C. Pablo Hernández Matamoros	_____
2do. SUPLENTE	Q. Lidia Elena Ballesteros Hernández	_____

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga*



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

ATN: LA. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el Trabajo de Tesis.

Evaluación de tequilas auténticos y destilados de agave mediante la determinación de furfural, 2-acetilfurano y 5-metilfurfural por HPLC y análisis multivariante a partir de datos UV-Vis.

Que presenta la pasante: Marisol Gutiérrez Vargas
Con número de cuenta: 414033836 para obtener el Título de: Licenciada en Química

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 20 de Noviembre de 2020.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	<u>Dra. María Guadalupe Pérez Caballero</u>	_____
VOCAL	<u>Dra. María Gabriela Vargas Martínez</u>	_____
SECRETARIO	<u>Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez</u>	_____
1er. SUPLENTE	<u>M. en C. Pablo Hernández Matamoros</u>	<u>Pablo Hdez</u>
2do. SUPLENTE	<u>Q. Lidia Elena Ballesteros Hernández</u>	_____

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga*



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: LA. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el Trabajo de Tesis.

Evaluación de tequilas auténticos y destilados de agave mediante la determinación de furfural, 2-acetilfurano y 5-metilfurfural por HPLC y análisis multivariante a partir de datos UV-Vis.

Que presenta la pasante: Marisol Gutiérrez Vargas

Con número de cuenta: 414033836 para obtener el Título de: Licenciada en Química

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 20 de Noviembre de 2020.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	<u>Dra. María Guadalupe Pérez Caballero</u>	_____
VOCAL	<u>Dra. María Gabriela Vargas Martínez</u>	_____
SECRETARIO	<u>Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez</u>	_____
1er. SUPLENTE	<u>M. en C. Pablo Hernández Matamoros</u>	_____
2do. SUPLENTE	<u>Q. Lidia Elena Ballesteros Hernández</u>	

DTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

ICF/cga*



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: L.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis.

Evaluación de tequilas auténticos y destilados de agave mediante la determinación de furfural, 2-acetilfurano y 5-metilfurfural por HPLC y análisis multivariante a partir de datos UV-Vis.

Que presenta la pasante: Ana Laura Vega Morales
Con número de cuenta: 311026825 para obtener el Título de: Licenciada en Química

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 07 de Agosto de 2020.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. María Guadalupe Pérez Caballero	
VOCAL	Dra. María Gabriela Vargas Martínez	
SECRETARIO	Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez	
1er. SUPLENTE	M. en C. Pablo Hernández Matamoros	
2do. SUPLENTE	Q. Lidia Elena Ballesteros Hernández	

NOTA: Los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).
En caso de que algún miembro del jurado no pueda asistir al examen profesional deberá dar aviso por anticipado al departamento.
(Art 127 REP)
LMCF/lmc*



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: LA. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis.

Evaluación de tequilas auténticos y destilados de agave mediante la determinación de furfural, 2-acetilfurano y 5-metilfurfural por HPLC y análisis multivariante a partir de datos UV-Vis.

Que presenta la pasante: Ana Laura Vega Morales
Con número de cuenta: 311026825 para obtener el Título de: Licenciada en Química

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcallí, Méx. a 07 de Agosto de 2020.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. María Guadalupe Pérez Caballero	
VOCAL	Dra. María Gabriela Vargas Martínez	
SECRETARIO	Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez	
1er. SUPLENTE	M. en C. Pablo Hernández Matamoros	
2do. SUPLENTE	Q. Lidia Elena Ballesteros Hernández	

NOTA: Los síndicos suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).
En caso de que algún miembro del jurado no pueda asistir al examen profesional deberá dar aviso por anticipado al departamento.
(Art 127 REP)
IMCF/InciP



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: LA. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el Trabajo de Tesis.

Evaluación de tequilas auténticos y destilados de agave mediante la determinación de furfural, 2-acetilfurano y 5-metilfurfural por HPLC y análisis multivariante a partir de datos UV-Vis.

Que presenta la pasante: **Ana Laura Vega Morales**

Con número de cuenta: **311026825** para obtener el Título de: **Licenciada en Química**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 07 de Agosto de 2020.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. María Guadalupe Pérez Caballero	_____
VOCAL	Dra. María Gabriela Vargas Martínez	_____
SECRETARIO	Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez	
1er. SUPLENTE	M. en C. Pablo Hernández Matamoros	_____
2do. SUPLENTE	Q. Lidia Elena Ballesteros Hernández	_____

NOTA: Los inmediatos suplentes están obligados a presentarse al día y hora del Examen Profesional (art. 127).

En caso de que algún miembro del jurado no pueda asistir al examen profesional deberá dar aviso por anticipado al departamento.

(Art. 127 REP)

LMCF/lnclP



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: LA. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el Trabajo de Tesis.

Evaluación de tequilas auténticos y destilados de agave mediante la determinación de furfural, 2-acetilfurano y 5-metilfurfural por HPLC y análisis multivariante a partir de datos UV-Vis.

Que presenta la pasante: Ana Laura Vega Morales

Con número de cuenta: 311026825 para obtener el Título de: Licenciada en Química

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 07 de Agosto de 2020.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. María Guadalupe Pérez Caballero	_____
VOCAL	Dra. María Gabriela Vargas Martínez	_____
SECRETARIO	Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez	_____
1er. SUPLENTE	M. en C. Pablo Hernández Matamoros	<i>Pablo Hernández</i>
2do. SUPLENTE	Q. Lidia Elena Ballesteros Hernández	_____

NOTA: Los síndicos sueltos están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

En caso de que algún miembro del jurado no pueda asistir al examen profesional deberá dar aviso por anticipado al departamento.

(Art 127 REP)

LMCF/lnvd*



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: LA. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis.**

Evaluación de tequilas auténticos y destilados de agave mediante la determinación de furfural, 2-acetilfurano y 5-metilfurfural por HPLC y análisis multivariante a partir de datos UV-Vis.

Que presenta la pasante: **Ana Laura Vega Morales**
Con número de cuenta: **311026825** para obtener el Título de: **Licenciada en Química**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcailli, Méx. a 07 de Agosto de 2020.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	<u>Dra. María Guadalupe Pérez Caballero</u>	_____
VOCAL	<u>Dra. María Gabriela Vargas Martínez</u>	_____
SECRETARIO	<u>Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez</u>	_____
er. SUPLENTE	<u>M. en C. Pablo Hernández Matamoros</u>	_____
fo. SUPLENTE	<u>Q. Lidia Elena Ballesteros Hernández</u>	

Dedicatorias

Es una emoción inmensa e indescriptible poder dedicar este trabajo a las personas que más quiero en la vida, se las dedico con mucho amor porque es un paso que costó tiempo, paciencia y recursos.

- A mis papás, Yolanda y Martin, porque han sido el pilar fundamental para que siguiera mis estudios y mis metas, los buenos valores y la educación que he tomado ha sido por ellos.*
- A mis hermanos, Eli y Martincito, por estar siempre al pendiente de mí, por qué de algún modo me presionaban para que me apurara a terminar la tesis y no desistiera, porque me motivan a ser una mejor persona, me apoyan y aconsejan.*
- A mis amigas, Ana y Norma por estar siempre en cada clase, cada duda, cada problema, cada locura, cada situación, con risas o lágrimas, siempre apoyándome y nunca dejarme sola.*
- A Víctor, por darme ánimos, su apoyo y su cariño, también por tomarse el tiempo para leer la tesis y por hacer que la carrera se me hiciera más amena gracias a su compañía.*
- A mis compañeros de la carrera porque en este largo camino se aprende a trabajar en equipo y a los compañeros que conocí en el servicio social y al realizar la tesis, ya que compartimos momentos y experiencias agradables en los congresos y laboratorios.*
- A toda mi familia, como mis primos y tíos por siempre estar al pendiente de mí, y a los que están en el cielo, en especial a mi prima Mary porque siempre creyó en mí.*
- Y porque no, también se la dedico a mi gata “manchas” por qué con su compañía me desestresaba cuando tenía mucha tarea.*

Marisol Gutiérrez Vargas

Dedicatorias

A mis padres, por ser mi guía y porque me ayudaron a establecer el orden en mi vida.

A Mario, por apoyarme e incitarme al desorden.

Ana Laura Vega Morales

Agradecimientos

El tener la presente tesis en mis manos, me llena de mucha alegría y nostalgia, es una meta que por fin se está cumpliendo, y todo es gracias a las personas que estuvieron al pendiente, que creyeron en mí y que aportaron a la presente.

¡Gracias!

- Principalmente a mis padres, ya que ellos me dieron el apoyo incondicional para terminar mis estudios, tanto económicamente como emocionalmente.*
- A mi compañera de tesis, Ana, porque nunca me dejó sola en cada paso de la carrera y de la vida, por sus consejos, apoyo y comprensión, obvio sin ella esta tesis no sería la misma, por su dedicación y conocimientos.*
- A mis asesores, la Dra. Lupita y el Dr. Olmos, por su gran paciencia, guía, apoyo, conocimientos y tiempo que le dedicaron para siempre mejorar la tesis.*
 - A los miembros del jurado por el tiempo dedicado a la revisión y sus observaciones para el mejoramiento de la presente tesis.*
 - A la universidad, la FESC que nos da los recursos para llevar acabo los estudios en sus instalaciones.*
 - A los compañeros que conocí en la FESC, principalmente a Víctor y Norma, por acompañarme en esta travesía y echarme porras.*
 - Al proyecto PAPIME (Clave. PE208418), por la beca otorgada.*
 - Al CRT por el suministro de las muestras de tequilas.*

Marisol Gutiérrez Vargas

Agradecimientos

Agradezco desde el fondo de mi corazón a todos por su apoyo, es un logro importante que marca el inicio de mi carrera profesional.

Principalmente a la vida por otorgarme a mis padres; Héctor Vega y Maricela Morales por creer en mí y dejarme soñar. A mis hermanas, Ángela y Lorena, que nunca me han dejado sola.

A Mario, por animarme, empujarme y demostrarme que todo es posible.

A mis asesores Dra. Guadalupe Pérez Caballero y Dr. José de Jesús Olmos Espejel, por su tiempo, sus enseñanzas y sus consejos, durante y después del proyecto.

A mis sinodales, por su tiempo y sus consejos.

A mis amigas y roomies, Norma Pérez y Magaly Carmona que hicieron divertida esta etapa, gracias por su amistad, el apoyo y los bonitos recuerdos. En particular a mi compañera de tesis Marisol Gutiérrez, gracias por tu paciencia, tu dedicación, tus conocimientos, tu entusiasmo, por perseguir juntas el mismo objetivo.

A mi universidad, la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por ofrecerme un mundo de conocimientos y oportunidades.

Y finalmente al proyecto PAPIME (Clave. PE208418) por la beca otorgada.

¡GRACIAS!

Ana Laura Vega Morales

INDICE GENERAL

ABREVIATURAS	II
TABLA DE BEBIDAS ANALIZADAS	III
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
CAPITULO I	3
3. OBJETIVOS	4
3.1 OBJETIVO GENERAL	4
3.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	4
CAPITULO II	5
4. ANTECEDENTES	6
5. MARCO TEÓRICO	7
5.1 DENOMINACIÓN DE ORIGEN.....	7
5.2 AGAVE	8
5.2.1 ABC de los destilados de agave	8
5.2.2 Elaboración de destilados de agave.....	9
5.3 ABC DEL TEQUILA	10
5.3.1 Elaboración del Tequila	11
5.3.2 Clasificación del tequila	12
5.4 PROCESOS BIOQUÍMICOS EN LA ELABORACIÓN DE BEBIDAS DESTILADAS DE ÁGAVE	13
5.4.1 Cocción: Hidrólisis de inulina.	13
5.4.2 Reacción de Maillard	14
5.4.3 Fermentación: fermentación alcohólica.....	15
5.4.4 Maduración o añejamiento	15
5.5 CARACTERÍSTICAS FISCOQUÍMICAS DE LOS COMPUESTOS FURÁNICOS	16
5.6 FUNDAMENTOS DE TÉCNICAS ANALÍTICAS	17
5.6.1 Espectroscopia UV-Vis	17
5.6.2 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución - HPLC (por sus siglas en inglés) ...	17
5.6.2.1 Repetibilidad.....	18
5.6.2.2 Especificidad	18
5.6.2.3 Límite de detección.....	18
5.6.2.4 Límite de cuantificación.....	18
5.6.2.5 Linealidad	18
5.7 ESTADÍSTICA	19
5.7.1 Análisis de normalidad.....	19
5.7.2 Prueba Shapiro-Wilk.....	19
5.7.3 Prueba Kolmogorov-Smirnov	19
5.7.4 Prueba Kruskal Wallis	19
5.8 FUNDAMENTO DE QUIMIOMETRÍA	20
5.8.1 Técnicas No Supervisadas	21
5.8.1.1 Análisis de Componentes Principales (PCA).....	21
5.8.1.2 Análisis Cluster (CA)	22
5.8.2 Técnicas Supervisadas	23
5.8.2.1 Support Vector Machine (SVM, por sus siglas en inglés)	24
5.8.2.2 k -Vecino más cercano (k-NN, por sus siglas en inglés).....	25
5.8.2.3 Análisis de Componentes Principales y Análisis Discriminante (PCA-DA).....	25
5.8.3 Parámetros de desempeño	25

CAPITULO III	26
6. METODOLOGÍA	27
6.1 MUESTRAS ANALIZADAS	27
6.2 EQUIPOS Y REACTIVOS.....	27
6.3 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	28
6.3.1 Espectroscopia UV-Vis	28
6.3.2 Análisis por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución	28
6.4 ANÁLISIS QUIMIOMÉTRICO	29
6.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	31
CAPITULO IV	32
7. RESULTADOS Y ANÁLISIS	33
7.1 ANÁLISIS ESPECTRAL UV-Vis	33
7.2 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO.....	34
7.2.1 Adecuación del método Cromatográfico	35
7.2.1.1 Repetibilidad del método	37
7.2.1.2 Linealidad de la curva de calibración	38
7.2.1.3 Análisis de efecto matriz.....	38
7.2.1.4 Límites de detección y cuantificación	39
7.2.5 Análisis de muestras problema.....	39
7.3 Prueba de normalidad	41
7.4 Cuantificación de 5-hidroximetilfurfural, furfural, 2-acetilfurano y 5- metilfurfural en destilados de agave y tequilas auténticos.....	42
7.5 Contenido de Furfural de acuerdo con la NOM-006	44
7.6 COMPARACIÓN ENTRE LOS MÉTODOS UV-VIS Y HPLC	45
7.7 ANÁLISIS QUIMIOMÉTRICO UV-Vis.....	48
7.7.1 Análisis de Componentes Principales (datos brutos) con UV-Vis	48
7.7.1.1 Destilados de agave vs. Tequilas blancos	48
7.7.1.2 Destilados de agave vs. Tequilas reposados.	56
7.7.1.3 Destilados de agave vs. Tequilas añejos y extra - añejos.....	62
7.7.2 Análisis Cluster (CA) con UV-Vis	67
7.7.2.1 Destilados de agave Vs Tequilas Blancos.....	67
7.7.2.2 Destilados de agave Vs Tequilas Reposados	67
7.7.2.3 Destilados de agave Vs Tequilas Añejos y Extra-añejos.....	69
7.7.3 Técnicas supervisadas	69
7.7.3.1 Support Vector Machines (SVM) con datos UV-Vis	70
7.7.3.1.1 Destilados de agave vs Tequilas Blancos.....	70
7.7.3.1.2 Destilados de agave vs Tequilas Reposados	70
7.7.3.2 Destilados de agave vs Tequilas Añejos y Extra-añejos.....	71
7.7.3.2 Análisis discriminante por componentes principales (PCA-DA) con UV-Vis.....	73
7.7.3.2.1 Destilados de agave vs tequilas blancos	73
7.7.3.2.2 Destilados de agave vs tequilas reposados	74
7.7.3.2.3 Destilados de agave vs tequilas añejos	75
7.7.3.3 Vecino más cercano (K-NN) para UV-Vis.....	76
7.7.3.3.1 Destilados de agave vs tequilas blancos	76
7.7.3.3.2 Destilados de agave vs tequilas reposados	77
7.7.3.3.3 Destilados de agave vs tequilas añejos	78
7.8 ANÁLISIS QUIMIOMÉTRICO PARA HPLC	79
7.8.1 Análisis de componentes principales (PCA) con HPLC.....	79
7.8.1.1 Destilados de agave vs tequilas blancos.....	79
7.8.1.2 Destilados de agave vs tequilas reposados.....	80
7.8.1.3 Destilados de agave vs tequilas añejos.....	80

8. CONCLUSIONES	82
9. REFERENCIAS	84
ANEXOS.....	90

ABREVIATURAS

2-AF: 2-acetilfurano
5-HMF: 5-hidroximetilfurfural
5-MF: 5-metilfufural
ANOVA: Análisis de varianza
ASCII: American Standard Code for Information Interchange
ATP: Trifosfato de adenosina
CA: Análisis Cluster
CMR: Consejo Regulador del Mezcal
CONACyT: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
CRT: Consejo Regulador de Tequila
DA: Destilado de agave
E.U.A: Estados Unidos de América
FTIR: Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier
FUR: furfural
HPLC: High Performance Liquid Chromatography/Cromatografía de líquidos de alta resolución
KNN: K Nearest Neighbors
LC: Limite de cuantificación
LD: Límite de detección
NOM: Normas Oficiales Mexicanas
OMPI: Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
PC: Componente Principal
PCA: Análisis de Componentes Principales
PCA-DA: Análisis Discriminante por componentes principales
pH: Potencial de hidrógeno
Profeco: Procuraduría Federal del Consumidor
SCFI: Secretaría de Comercio y Fomento Industrial
SNV: Standard Normal Variate
SVM: Support Vector Machines
TA: Tequila añejo
TB: Tequila blanco
TMB: Tequila blanco mixto
TMR: Tequila reposado mixto
TR: Tequila reposado
UV-Vis: Ultravioleta-Visible

Tabla de bebidas analizadas

<i>N°</i>	<i>Clave</i>	<i>% Etanol</i>	<i>Procedencia o Nombre de la bebida</i>
1	DA 01	28	La moreña
2	DA02	26	Penca verde
3	DA 04	30	Hacienda potrillos
4	DA 05	28	Cardenal
5	DA 06	38	Saldaña
6	DA 08	34	El capricho
7	DA 10	28	El músico
8	DA 12	34	Berriendo
9	DA 15	28	El lagunero
10	DA 16	28	El compadre
11	DA 20	28	Enigma
12	DA 21	26	Dos Corazones
13	DA 22	30	Viva agave
14	DA 24	34	Rio seco
15	DA 25	34.9	Don Kiko y su mesón
16	DA 26	28	El fabuloso etiqueta negra
17	DA 27	28	Alma de xalisco
18	DA 28	35	Oro de Guanajuato
19	DA 29	35	Plata de Guanajuato
20	DA 64	34.9	
21	DA 65	28	
22	DA 66	28	
23	LA 03	28	Mujeriego
24	LA 07	28	Santos y nobles

25	LA 09	28	<i>Potrero</i>
26	LA 11	28	<i>Vértigo</i>
27	LA 13	26	<i>La pasión de mi tierra</i>
28	LA 14	30	
29	LA 17	26	<i>Hacienda de Acapulco</i>
30	LA 18	26	<i>Rancho mi niña</i>
31	LA 19	28	
32	LA 23	26	<i>Hacienda las correctas</i>
33	LA 42	26	<i>Rancho escondido</i>
34	LA 47	26	
35	LA 49	28	
36	TB2-A	40.1	
37	TB 2-B	52.346	
38	TB 4	54.442	
39	TB6-A	55	
40	TB 6-B	34.984	
41	TB 18	54.6	
42	TB 19	54.8	
43	TB 20	35	
44	TB 25	40.1	
45	TB26	40	
46	TB29	40	
47	TB30	40	
48	TB32	67.3	
49	TB 36	54	
50	TB37	50	

51	TB 38	55	
52	TB43	40.03	
53	TB 47	40	
54	TB50	43.7	
55	TB55	40	
56	TB 61	57.01	
57	TB 62	53.9	
58	TB74	35.4	
59	TB113	40	
60	TB115	49	
61	TB120	38	
62	TB121	40	
63	TB124	40	
64	TB152	49.5	
65	TB153	40	
66	TMB 3	41.1	
67	TMB9	55	
68	TMB 10	40	
69	TMB 11	55.51	
70	TMB 13	54.812	
71	TMB15-A	35	
72	TMB 15-B	35	
73	TMB16	54.8	
74	TMB 17	51.5	
75	TMB 23	55	
76	TMB24	40	

77	TMB25	38.2	
78	TMB 28	54.7	
79	TMB31	55	
80	TMB 33	55	
81	TMB 34	79.08	
82	TMB 35	56.16	
83	TMB 39	55	
84	TMB40	55	
85	TMB 41	43.78	
86	TMB43	43.32	
87	TMB 44	43.6	
88	TMB 45	39.96	
89	TMB46-A	49	
90	TMB 46-B	40	
91	TMB 48		
92	TMB 52		
93	TMB 54		
94	TMB 59		
95	TMB65	51.51	
96	TMB67	35.3	
97	TMB85	55	
98	TMB133	53.206	
99	TR 5	53.436	
100	TR 12	35.3	
101	TR 19	40.2	
102	TR 28	35	

103	TR 29	40.1	
104	TR 63	57.08	
105	TR 65	40.05	
106	TR 75		
107	TR 76		
108	TR 77 B	40.023	<i>San Ignacio Cerro Gordo</i>
109	TR 77 C		
110	TR 78		
111	TR 79		
112	TR80		
113	TR 82		
114	TR 93		
115	TR 95		
116	TR 99		
117	TR 100	45.6	
118	TR 106		
119	TR 111		
120	TR 112		
121	TR 113		
122	TR 114		
123	TR 116		
124	TR 129		
125	TR 130		
126	TMR 24	51.8	
127	TMR 26	35	
128	TMR 27	40	

129	TMR 30	35	
130	TMR 40	38	
131	TMR 42	54.53	
132	TMR 55		
133	TMR 56		
134	TMR 58		
135	TMR 76	35	
136	TMR 81		
137	TMR 83		
138	TMR 104	38	
139	TMR 126	35.210	<i>Tequila</i>
140	TMR 129	35	
141	TA 6	40	
142	TA 13	40	
143	TA 15	38.05	
144	TA 19	50.08	
145	TA 21	40	
146	TA 26	40	
147	TA 27	54.3	
148	TA 29	40.3	
149	TA 30	40	
150	TA 43	40.002	<i>Tequila</i>
151	TA 68	40	
152	TA 84		
153	TA85		
154	TA 86		

155	TA 87		
156	TA 88		
157	TA 96		
158	TA 99	40	
159	TA100		
160	TA 101	40	
161	TA105		
162	TA 108B	51.8	
163	TA 108 C		
164	TA 121		
165	TA 133	38	
166	TEA10	52.8	
167	TEA 15	38	<i>La Laja</i>
168	TEA22	51	
169	TEA27	54.1	
170	TEA 43	40.092	<i>Tequila</i>
171	TEA90		
172	TEA 98		
173	TEA 104		
174	TEA 128	38	

1. RESUMEN

En la presente tesis se llevó a cabo la construcción de modelos por medio de técnicas multivariantes supervisadas y no supervisadas para discriminar entre tequilas auténticos y destilados de agave, a partir de datos analíticos obtenidos por espectrofotometría UV-Vis y Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC). Todas las muestras incluidas en este estudio fueron suministradas por el Consejo Regulador del Tequila (CRT).

En general se ostentan dos estudios, en el primero se adecuó un método cromatográfico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) para cuantificar 4 compuestos furánicos: 5-hidroximetilfurfural (5-HMF), furfural (FUR), 2-acetilfurano (2-AF) y el 5-metilfurfural (5-MF) a través de curvas de calibración. Los resultados mostraron que el contenido de compuestos furánicos en los tequilas es mayor que en los destilados. La prueba de Kruskal Wallis permitió establecer que existe esta diferencia significativa con 95 % de confianza. El segundo estudio consistió en la construcción de modelos quimiométricos óptimos a partir de datos UV-Vis, con técnicas no supervisadas como Análisis de Componentes Principales -PCA- y Análisis Clúster -CA- y técnicas supervisadas como Support Vector Machines -SVM-, Análisis discriminante por componentes principales -PCA-DA- y Vecino más cercano -KNN-.

El presente trabajo propone una estrategia quimiométrica a partir del tratamiento de datos de HPLC y de UV-Vis, viable, y económica para llevar a cabo la diferenciación de tequilas auténticos y destilados de agave que puede ser utilizada por el Consejo Regulador del Tequila (CRT) u otras instancias relacionadas con la producción y comercialización del tequila.

2. INTRODUCCIÓN

El Tratado de Lisboa contempla la protección de las denominaciones de origen, o sea, la “denominación geográfica de un país, de una región, o de una localidad que sirva para designar un producto originario del mismo y cuya calidad o características se deben exclusiva o esencialmente al medio geográfico, comprendidos los factores naturales y los factores humanos” [1]. Las denominaciones de origen se encuentran reguladas por las normas oficiales mexicanas (NOM). Al tequila lo rige la NOM-006-SCFI-2005 [2], al mezcal la NOM-070-SCFI-1994 [3] y a la bacanora la NOM-168-SCFI-2004 [4]. Para la operación de estas bebidas existen organismos de certificación acreditados que verifican y vigilan que el producto efectivamente mantenga los estándares de calidad requeridos lo cual también es de interés para la Profeco. Así, en 1993 se creó el Consejo Regulador del Tequila (CRT) y en el 2003 el Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal A.C (CMR) [5].

Este trabajo se enfocó al estudio comparativo de tequilas auténticos y destilados de agave sin denominación de origen. La principal diferencia entre estas bebidas es la materia prima utilizada para su elaboración. El tequila se produce únicamente a partir del Agave tequilana Weber variedad azul, además de poseer con una denominación de origen. Los destilados pueden ser elaborados por combinaciones y/o diferentes agaves de las 211 especies de agave existentes en la república y no cuentan con denominación de origen, por lo que comúnmente dichas bebidas son vendidas en el mercado a un precio más bajo. Sin embargo, en muchos casos su origen puede ser dudoso y por tanto su calidad, por no estar regulados por norma alguna.

Prácticamente, para obtener un destilado de agave o tequila se lleva a cabo la fermentación de los carbohidratos contenidos en el jugo de las piñas obtenidas del agave y su posterior destilación. En una etapa, las piñas sufren un proceso de cocción durante aproximadamente 36-48 horas [6]; durante este paso ocurre la hidrólisis de los polisacáridos, especialmente de la inulina para generar azúcares fermentables (fructosa y glucosa), de igual manera se originan compuestos volátiles y compuestos de Maillard, la mayoría de los cuales puede tener un impacto significativo en el sabor del tequila [6].

CAPITULO I

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Diferenciar entre tequilas auténticos y destilados de agave mediante la determinación de furfural, 2-acetilfurano y 5-metilfurfural por HPLC y la elaboración de modelos quimiométricos a partir de datos UV-Vis con la finalidad de contar con estrategias óptimas y confiables que garanticen la autenticidad de los tequilas comerciales.

3.2 Objetivos particulares

- Construir modelos quimiométricos adecuadas a partir de datos de espectros de absorción obtenidos por espectrofotometría UV-Vis para conseguir discriminar los tequilas auténticos de los destilados de agave mediante técnicas no supervisadas (Análisis de Componentes Principales -PCA-, Análisis Clúster -CA-) y supervisadas (SVM, PCA-DA y K Nearest Neighbors -KNN-que sean de utilidad para organismos como el Consejo Regulador del Tequila (CRT).
- Determinar las condiciones cromatográficas óptimas para la determinación de furfural, 2-acetilfurano y 5-metilfurfural en muestras de tequila auténtico y destilados de agave.
- Determinar furfural, 2-acetilfurano y 5-metilfurfural en tequilas auténticos y destilados de agave por medio de HPLC mediante curvas de calibración.
- Evaluar si los contenidos de derivados furánicos permiten lograr la discriminación entre tequilas auténticos y destilados de agave.
- Analizar estadísticamente los datos cromatográficos obtenidos para correlacionarlos por técnicas multivariantes.
- Comparar los resultados obtenidos por el método cromatográfico y quimiométrico.

CAPITULO II

4. ANTECEDENTES

El origen de los agaves data aproximadamente hace 10 millones de años; en nuestro país se han diversificado y es donde han sido más utilizados. Algo más reciente es su uso para bebidas destiladas [7].

Actualmente, algunas metodologías han sido reportadas en la literatura para la diferenciación entre tequilas 100 % agave y mixtos mediante la determinación del contenido de metanol y de 2- y 3-metil-1- butanol por cromatografía de gases [8]. Asimismo, se han realizado análisis comparativos de sus respectivos espectros infrarrojos [9]. Para determinar el grado de envejecimiento, se ha reportado el uso de cromatografía iónica y la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) [9], así como el análisis de isótopos estables [10]. Otras investigaciones, han realizado la determinación por HPLC-DAD de furfural, 2-acetilfurano y 5-metilfurfural como marcadores de envejecimiento del tequila [11]; sin embargo, estos compuestos están presentes en muestras de tequila no envejecidas, y pertenecen al grupo de compuestos furánicos generados por la reacción de Maillard durante la cocción del agave [12]. Por lo tanto, estos furfurales serán utilizados para poder diferenciar los tequilas auténticos y destilados de agave, provenientes del CRT. Vale la pena mencionar que la regulación mexicana para el tequila no establece ningún análisis pruebas para verificar la autenticidad del tipo de tequila o la edad.

5. MARCO TEÓRICO

A continuación, de acuerdo con la problemática que se presenta en este trabajo, para abordar el tema es necesario describir de manera concreta los elementos teóricos indispensables.

5.1 Denominación de Origen

El reconocimiento de productos por su origen geográfico concede una ventaja comercial y natural, llamada así por Adam Smith [13] en su “Teoría de la ventaja absoluta”, a unas zonas del planeta respecto a otras. Con el objetivo de proteger zonas geográficas, en las que se obtienen productos con características exclusivas del lugar, se creó la denominación de origen, la cual entró en vigor en 1966 por el Tratado de Lisboa en el que están establecidos los requisitos de un producto para recibir la protección debida. La Organización Mundial de la Propiedad Intelectual (OMPI) lleva el registro de las denominaciones de origen a nivel internacional [14]. Esta organización da la siguiente definición:

Denominación de origen: es un tipo de indicación geográfica que, por lo general, consiste en un nombre geográfico o en una designación tradicional que se utiliza en productos que tienen cualidades o características específicas que se den **esencialmente** al entorno geográfico de su producción (OMPI, s.f., s.p., cursivas añadidas). Esta definición exige:

1. La existencia de una zona geográfica delimitada (propuesta por interesados)
2. Un reconocimiento o renombre comprobado del lugar geográfico (declaratoria)
3. Condiciones precisas de producción (Norma)
4. Tipicidad.

En general, existe un consenso entre los expertos de la materia quienes aceptan que los factores decisivos en una denominación de origen son los siguientes y en ese orden:

1. Clima. La Intensidad lumínica, horas/luz, precipitación pluvial, Temperatura, Humedad relativa.
2. Suelo. Son factores relevantes la textura del suelo y la química del suelo.
3. Especie vegetal. En el caso del Tequila, sabemos que el vegetal utilizado es el Agave tequilana Weber variedad azul. Especie endémica y, por lo tanto, perfectamente adaptado a las condiciones climatológicas y de suelo.
4. Actividades humanas. Se refiere a las labores humanas involucradas desde el cultivo del agave, su cosecha, producción y maduración del Tequila. Estas actividades pueden incluir la técnica, tradiciones artesanales y habilidades [15].

5.2 Agave

Desde la antigüedad el agave o mejor conocido como maguey, tiene gran importancia socioeconómica y de desarrollo cultural en México. El género agave es originario de Mesoamérica y exactamente México es el centro de origen y diversidad de dicha planta. El 55 % de las especies crecen exclusivamente en nuestro país, pertenecientes al género Agaváceas [16, 17], lo que nos indica la importancia biológica del territorio. De manera general, se trata de una planta monocárpica, suculenta, de naturaleza multifuncional y polifacética. Dichas características han sido aprovechadas por el hombre, en la conservación de suelos, forraje, producción de insectos comestibles y el más relevante, producción de bebidas destiladas [17,18]. En la actualidad, se explotan diferentes especies de agave para la producción de estas bebidas.

5.2.1 ABC de los destilados de agave

Se trata de bebidas destiladas con alto grado de alcohol (30-45 %) producidas por la fermentación y destilación controlada de azúcares producidos tras la cocción y estrujado de la piña o tallo del agave.

Las teorías sobre los orígenes de los destilados de agave, en resumen, cuentan que surgió en los estados de Jalisco y Colima a partir de un destilador filipino con el que se obtenía “vino de cocos” y la introducción del cultivo de caña de azúcar, así que, se adaptó el procedimiento a fermentos de agave [19]. Existen evidencias arqueológicas como hornos de piedra, cenizas y piedras calcinadas, que comprueban la elaboración de bebidas destiladas confirmando la importancia cultural y social de los agaves en Colima desde la época precolombina [20].

Un destilado de agave, de manera general, suele ser llamado Mezcal, nombre proveniente del náhuatl mezcalli que significa “cocimiento de maguey”. Aunque los nombres de los diferentes destilados de agave se originan según las especies utilizadas como materia prima y la región geográfica donde se encuentra cultivado. La variedad de éstos es grande; sin embargo, los más conocidos son el tequila, la bacanora, el sotol, el sisal y la raicilla, bebidas artesanales ampliamente consumidas por un gran sector de la población en el país. En la **Figura 1** se muestra la ubicación geográfica de algunos destilados de agave junto con el agave utilizado para su producción [21, 22].

De las diferentes especies de agave, cuyo jugo puede ser fermentado y destilado para la producción de bebidas alcohólicas, sólo cinco de éstos cuentan con denominación de origen: tequila, mezcal, bacanora sotol y raicilla [5].

Se han registrado 57 taxones en la clasificación de agaves para el uso de bebidas destiladas de agave, entre los cuales hay 43 especies (incluyendo al tequila), siete subespecies y siete variedades [23].

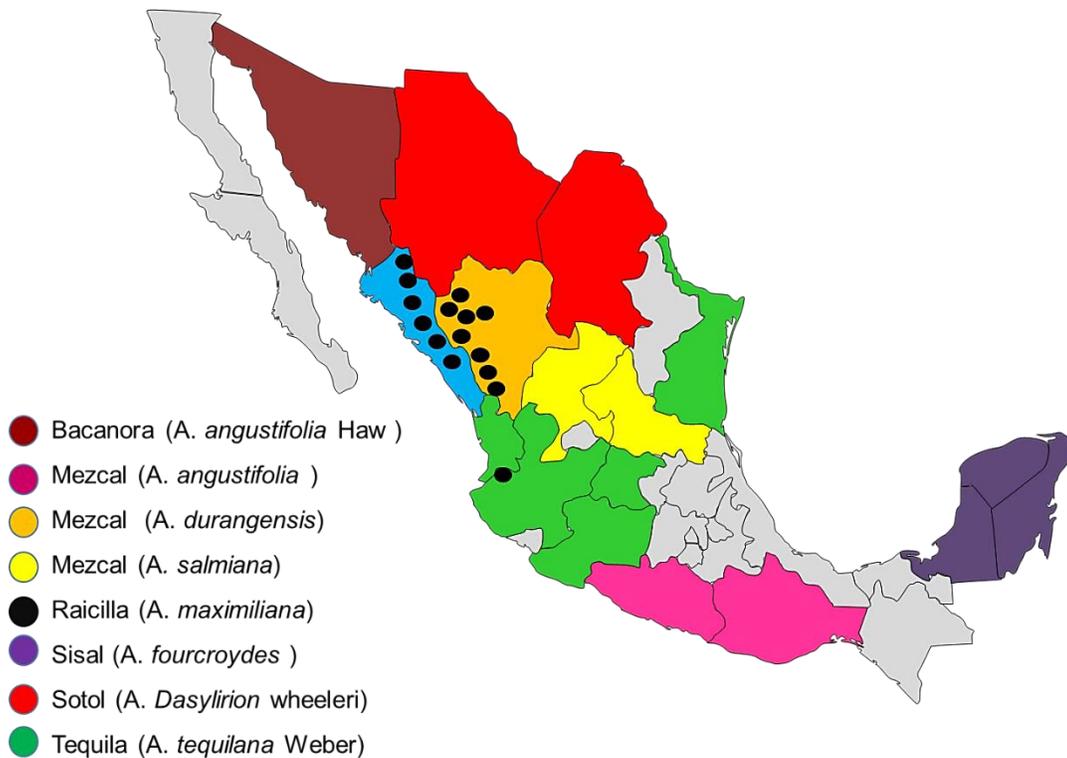


Figura 1. Ubicación geográfica de algunos destilados de agave y los agaves utilizados para su producción. Fuente: elaboración propia.

5.2.2 Elaboración de destilados de agave

La elaboración de los destilados de agave generalmente suele ser tradicional y en pequeñas casas de producción; además de las especies de agave utilizadas, están diferenciados por los procesos de cosecha y jima, cocimiento, molienda, fermentación, y destilación, los cuales son ilustrados en la **Figura 2** [16].

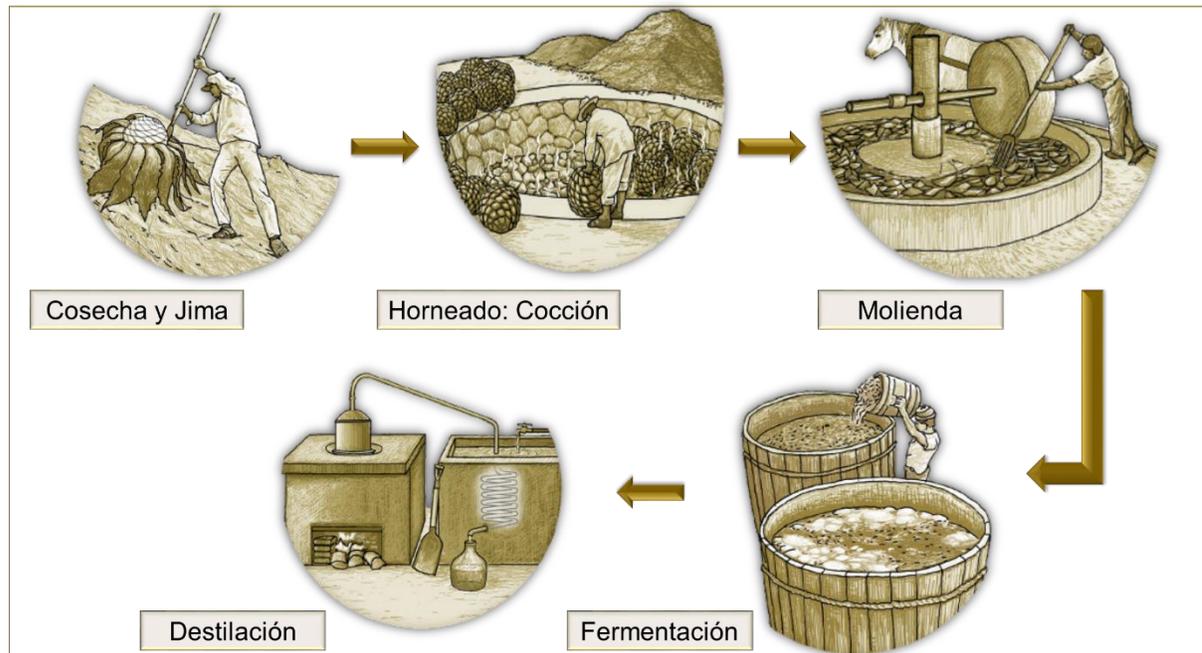


Figura 2. Proceso general de la obtención de los destilados de agave.

Fuente: Conabio. (2006). *Mezcales y diversidad*, 2da ed. 10/07/19 de Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México sitio web: <http://200.12.166.51/janium/Documentos/5324.pdf>

5.3 ABC del Tequila

El tequila es una bebida regional que representa a México en muchos aspectos; no es posible hablar de cualquier otra bebida originada del agave sin mencionar o tomar como referencia al tequila. No sólo en México, si no en el mundo es identificado como símbolo de mexicanidad. Su producción total se ha incrementado al 60 % en los últimos años [24].

Se originó en un municipio de Jalisco, primitivamente llamado Tequillan o Tecuila haciendo referencia a quienes trabajaron la piedra típica de la región, tecatlis. En este municipio, actualmente llamado Tequila, se cultiva y produce el único agave del que se obtiene la bebida, Agave tequilana Weber variedad azul, llamado así por Franz Weber quien comprobó que era el agave más abundante [25]. Por tanto, es un producto que cuenta con denominación de origen, promulgada en 1977, pero modificada posteriormente para incluir otros municipios de Jalisco y otros estados de la república representados en la **Figura 3**, por lo que el área actual consta de 181 municipios [5].

Así que, el tequila se define como una mezcla de alcoholes, producto de la transformación del agave.



Figura 3. Ubicación geográfica de la denominación de origen del tequila.
Fuente: elaboración propia.

5.3.1 Elaboración del Tequila

El Agave tequilana Weber variedad azul alcanza madurez entre seis y 10 años y entonces es utilizado para el procedimiento tradicional del tequila. Consta de seis o siete pasos básicos representados en la **Figura 4**, cada uno con sus respectivas modificaciones según la casa tequilera en cuestión: Jima, Cocción, Extracción, Fermentación, Destilación y Añejamiento. Para una descripción más detallada se proporcionan algunas referencias [15,25].

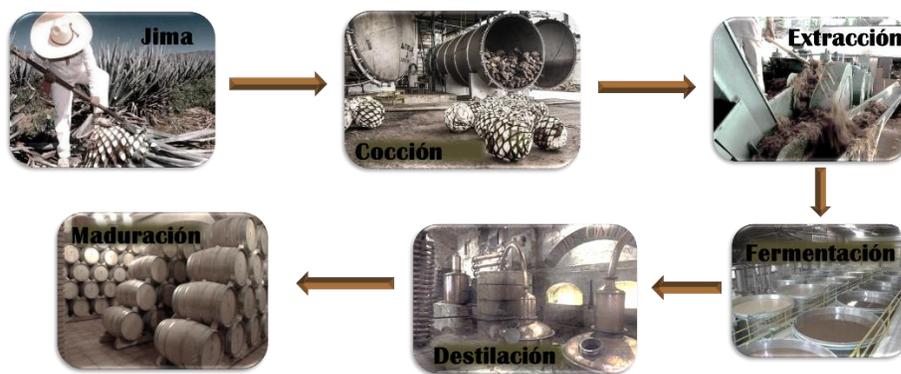


Figura 4. Procedimiento de elaboración del Tequila.

5.3.2 Clasificación del tequila

De acuerdo con la NOM-006-SCFI-2005 [2], el tequila se clasifica por categorías y clases, las cuales se resumen en la siguiente **Figura 5**.

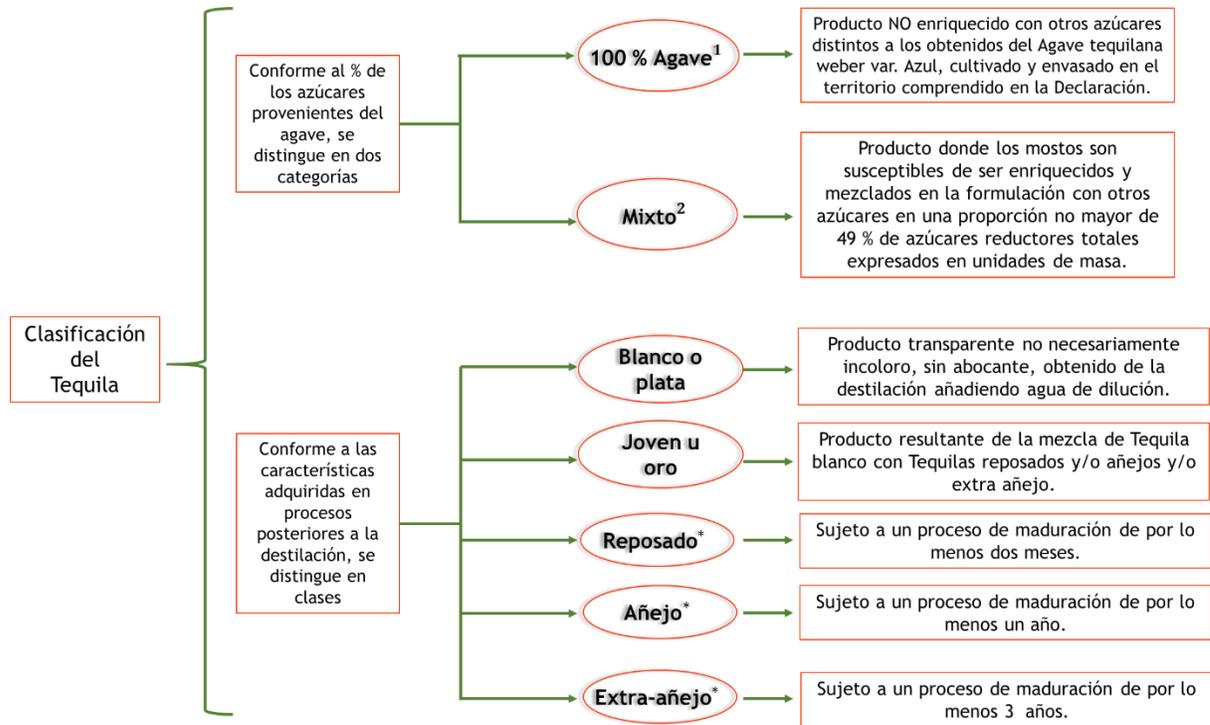


Figura 5. Clasificación del tequila. Fuente: Elaboración propia.

¹ Este producto debe ser denominado únicamente a través de alguna de las siguientes leyendas: "100 % de agave", "100 % puro de agave", "100 % agave", o "100 % puro agave", al final de las cuales se puede añadir la palabra "azul" [26].

² Sólo se podrá incrementar como mínimo el 51 % de azúcares reductores totales expresados en unidades de masa provenientes de Agave de la especie tequilana weber variedad azul cultivado en el territorio comprendido en la Declaración [26].

*Producto susceptible de ser abocado.

*El proceso de maduración es en contacto directo con la madera de recipientes de roble o encino.

En todos los tequilas el contenido alcohólico comercial debe, en su caso, ajustarse con agua de dilución [26].

5.4 Procesos bioquímicos en la elaboración de bebidas destiladas de Agave

5.4.1 Cocción: Hidrólisis de inulina.

La inulina ($C_6H_{10}O_5)_n \cdot H_2O$) está presente en varias raíces de plantas de la familia a la que pertenece el agave, y actúa como reserva de carbohidrato en las mismas. Su estructura química se muestra en la **Figura 6**; es un polímero formado por una cadena lineal de D-fructosa unida a una molécula de glucosa. Como tal no es un compuesto directamente fermentable, de ahí la importancia de la hidrólisis en la producción de las bebidas; la inulina es transformada en fructosa y glucosa por hidrólisis ácida durante la cocción [25].

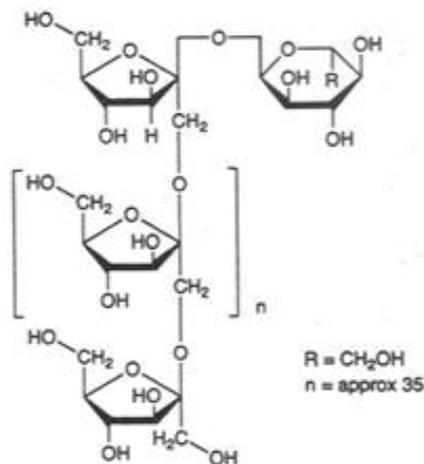


Figura 6. Estructura química de la inulina.

Fuente: Inulina, sitio web: <https://www.fisiologoi.com/paginas/inulina.htm>

Durante la cocción suceden varios cambios químicos en la materia prima que generan azúcares fermentables, compuestos volátiles y compuestos de Maillard, la mayoría de los cuales pueden tener un impacto significativo en las propiedades organolépticas de las bebidas destiladas. Sin embargo, no siempre estos cambios son benéficos, al carecer de un control ajustado en el cocimiento y en la calidad de la materia prima hay gran pérdida de azúcares reductores y menor eficiencia de la fermentación en los jugos debido a sus efectos inhibitorios [12,25].

La generación de compuestos volátiles, como los compuestos furánicos, es directamente proporcional al tiempo de cocimiento de la piña del agave; estos compuestos persisten en el producto final y no se eliminan en etapas posteriores (fermentación, reposo y envejecimiento, según sea el caso) como otros.

5.4.2 Reacción de Maillard

Descrita por primera vez por el investigador francés Louis-Camille Maillard (1878-1936) [27]. La reacción de Maillard es común durante el calentamiento de alimentos y se correlaciona directamente cuando se obtiene un color marrón, debido a que se produce un oscurecimiento no enzimático, a causa del ataque nucleofílico del grupo amino de un aminoácido a un grupo carbonilo de un carbohidrato (reacción de Amadori), y es seguida de una cascada de reacciones que generan compuestos volátiles muy aromáticos como el furfural, el 5-hidroximetilfurfural y las premelanoidinas, aunque los carotenoides u otros pigmentos podrían estar contribuyendo a este color [12, 22].

La reacción de Maillard se puede subdividir en tres etapas [28]:

1° Etapa inicial

Comienza con la condensación entre el grupo carbonilo libre de un azúcar reductor o lípido oxidado y el grupo amino de un aminoácido, péptido o proteína que, tras deshidratación, da lugar a una base de Schiff inestable que se transforma en glicosamina-N-sustituida. Esta reacción es reversible ya que en un medio ácido se regenera el azúcar y el aminoácido. Las glicosilaminas son más estables cuando proceden de aminas aromáticas.

2° Etapa intermedia

Se produce la inmediata reorganización irreversible de la glicosamina-N-sustituida. Cuando se parte de una aldosilamina-N-sustituida, mediante la transposición de Amadori, se genera el 1-amino-1-desoxi-2-cetosa, mientras que cuando se parte de una cetosilamina-N-sustituida, mediante la transposición de Heyns se genera 2-amino-2-desoxialdosa.

Los compuestos de Amadori y de Heyns sufren una serie de descomposiciones que varían en función del pH o de la temperatura del medio. Ambas reacciones dan lugar a compuestos con color y olor. A partir de los compuestos Amadori surgen 3 rutas diferentes; una de ellas es la responsable de producir compuestos furánicos, siendo éstos los compuestos estudiados en el presente trabajo.

A pH ácido se produce una enolización en posición 1,2 que origina compuestos dicarbonílicos (potentes precursores del pardeamiento) que dan lugar a 5-hidroximetilfurfural o furfural.

3° Etapa Final

Da lugar a compuestos nitrogenados: las melanoidinas y los compuestos avanzados de la reacción de Maillard que aportan sabores, aromas. La diferencia de estos

compuestos se puede deber a los parámetros de cocción utilizados en cada destilería, además a la calidad y edad de la materia prima [12,28].

Para el caso de los furánicos, Mancilla y López. (2002) reportan que a excepción del 2-acetilfurano, sus concentraciones son notablemente inferiores al final en comparación con el inicio del proceso, debido a que son componentes volátiles perdiéndose principalmente en la destilación [5,12]. Aunque sus concentraciones pueden aumentar durante el tiempo de envejecimiento como resultado de la extracción de roble [11].

5.4.3 Fermentación: fermentación alcohólica

La glucólisis es la ruta bioquímica que inicia con el procedimiento de fermentación, formando el gliceraldehído 3-fosfato que posteriormente por una reacción de óxido-reducción genera ATP y dos moléculas de piruvato. Finalmente llega la fermentación dando como resultado etanol y dióxido de carbono. La calidad del alcohol obtenido en esta etapa depende de la cantidad de azúcares reductores [25, 29].

5.4.4 Maduración o añejamiento

Durante el envejecimiento del tequila, ocurren complejos cambios químicos en los barriles de roble, componentes de madera se extraen en el tequila, proporcionando su color y sabor característico. La ocurrencia de estos compuestos en bebidas alcohólicas es el resultado de la lignina de roble, procesos de degradación y oxidación y se considera evidencia que la bebida alcohólica se ha envejecido auténticamente en un barril de roble [11].

El añejamiento es uno de los pasos más susceptibles a la adulteración, en el cual se puede agregar extractos de roble o colorante de caramelo al tequila blanco durante la producción para simular el color de los tequilas envejecidos en barricas de roble [11].

A pesar de ello, es posible autenticar esta producción, al detectar los compuestos que adquiere el tequila durante el envejecimiento. En particular, los compuestos identificados en tequilas añejados en barricas de roble varios compuestos son: la vainillina, el 5-hidroximetilfurfural, y el siringaldehído [12], los cuales no han podido ser detectados en tequilas blancos [11]. Esto podría deberse a la pérdida de los compuestos volátiles durante la fase de destilación en la producción de tequila [7].

El 5-hidroximetilfurfural, se podría originar de la carbonización de las barricas de roble; ha sido demostrado que aumenta con el envejecimiento en roble [7,11].

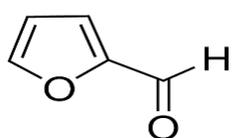
El aroma y sabor de las bebidas alcohólicas, son el resultado de la existencia de numerosos compuestos volátiles, principalmente metanol y alcoholes superiores (volátiles mayoritarios), así como ésteres, aldehídos, cetonas, ácidos, furanos y terpenos (volátiles minoritarios) y no-volátiles, cuya mezcla compleja define sus

atributos sensoriales y la aceptación por el consumidor); sin embargo, pueden ser tóxicos en concentraciones altas, por lo que están regidos por las normas oficiales mexicanas NOM-070-SCFI-1994 y NOM-006-SCFI-2005 [3, 22, 11, 30].

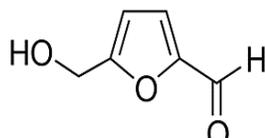
Los compuestos volátiles tienen diferente origen: a) Pueden estar contenidos en la materia prima y variar entre especies, regiones geográficas y entre condiciones climáticas de cultivo; o b) Pueden generarse durante la fermentación en función de la cepa, características del mosto y condiciones del proceso, o durante la maduración del producto [22].

En el caso del furfural se ha demostrado que se forman a partir del procesamiento térmico de trigo, centeno, cebada y achicoria. Todos estos cultivos tienen fructanos comunes como carbohidratos de reserva, similar al agave. El furfural podría, por lo tanto, estar formado por el camino de Heyns. Debido a la mayor cantidad de carbohidratos con respecto a aminoácidos o proteínas en el agave [12,29].

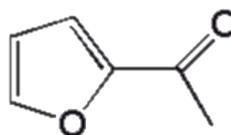
5.5 Características fisicoquímicas de los compuestos furánicos



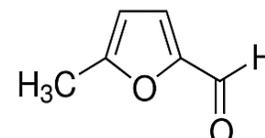
Furfural
Aldehído aromático
Líquido amarillo claro, cambia a marrón por acción de la luz y aire.
Densidad: 1.16g/cm³
MM: 96.09g/mol
Punto de ebullición: 161.7°C
Poco soluble en agua, soluble en solventes orgánicos [31].



5-Hidroximetilfurfural
Sólido blanco
Densidad: 1.24g/ml
Punto de fusión: 28-34°C
Punto de ebullición: 115°C
Soluble en agua, alcohol, acetato de etilo, acetona, dimetilformamida, benceno, éter y cloroformo.
Sensible al aire y luz [32].



2-acetilfuran
Líquido transparente/
sólido cristalino
Densidad: 1.098 g/ml (20 °C)
MM: 110.11 g/mol
Punto de fusión: 29-33 °C
Punto de ebullición: 183 °C
Insoluble en agua [33].



5-Metilfurfural
Líquido marrón claro
Densidad: 1.16g/ml
Punto de ebullición: 162 °C [32].

5.6 Fundamentos de técnicas analíticas

5.6.1 Espectroscopia UV-Vis

Las técnicas espectroscópicas se basan en la interacción de la radiación electromagnética con la materia. En la espectroscopia UV-Visible, la especie química absorbe la radiación en esa región espectral y la energía adquirida por el sistema causa la transición de los electrones más externos de los átomos de las moléculas, desde niveles fundamentales a niveles más altos de energía [34, 35].

La región espectral correspondiente al ultravioleta y visible, es comprendida desde el UV lejano con longitud de onda entre 100 y 200 nm, UV cercano entre 200 y 400 nm y visible entre 400 y 800 nm, tal como lo representa la Figura 7 [36].

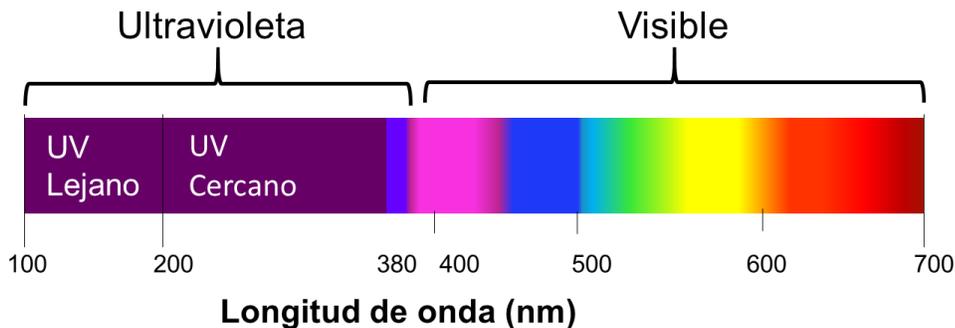


Figura 7. Espectro electromagnético UV-Vis.

Fuente: Elaboración propia a partir de sitio web: <https://www.logicclean.es/la-desinfeccion-esterilizacion-luz-ultravioleta/>

5.6.2 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución - HPLC (por sus siglas en inglés)

El término “cromatografía” combina dos términos griegos, *chroma* que significa color y *graphein* que significa escribir [37]. El fundamento de esta técnica se basa en la separación de analitos en función de su afinidad diferencial por la combinación de interacciones con las fases estacionaria y móvil.

En la cromatografía líquida, para que tenga lugar el proceso físico-químico de separación, la muestra es inyectada en el seno de la fase móvil, en la que es soluble, e impulsada mediante el bombeo a una elevada presión a través de una columna que contiene la fase estacionaria [38].

Siendo HPLC, una técnica analítica, se establecen características o parámetros de desempeño que se obtienen durante el estudio, para evaluar si es adecuado en cierto análisis, basándose en criterios de aceptación descritos en diferentes normas de farmacopeas o guías de validación. Si el requisito no se cumple, el método requiere un mayor desarrollo [39].

Los parámetros de desempeño evaluados principalmente en este trabajo son:

5.6.2.1 Repetibilidad

Capacidad del método para generar los mismos resultados bajo las mismas condiciones operativas en un intervalo de tiempo corto.

Criterio de aceptación $\leq 2\% - 3\%$ [40, 41].

5.6.2.2 Especificidad

Mide la capacidad del método para identificar/cuantificar de manera precisa y específica el analito de interés en presencia de otros componentes que pueden estar en la muestra (especificidad) o que se pudieran presentar por efectos ambientales y/o de interacción con los mismos componentes (selectividad) tales como: impurezas, productos de degradación o componentes de la misma muestra [40, 42].

5.6.2.3 Límite de detección

El límite de detección (LD o LOD) se define como la concentración mínima de un analito en una muestra que puede ser detectado, pero no necesariamente cuantificado con un determinado grado de certidumbre bajo las condiciones experimentales establecidas. El LD puede ser determinado por señal a ruido (S/N), o basado en la desviación estándar de la respuesta y la pendiente de una curva de calibración [41, 42].

5.6.2.4 Límite de cuantificación

El límite de cuantificación (LC o LOC) se define como la concentración mínima de un analito en una muestra que puede cuantificarse con precisión y exactitud bajo las condiciones experimentales establecidas. El LC puede determinarse por algunos de los mismos procedimientos utilizados para determinar el LD [40, 41, 42].

5.6.2.5 Linealidad

Capacidad del método de producir resultados directamente proporcionales a la concentración de analito dentro de un rango dado. Se debe establecer por medio de un método estadístico apropiado (como por ej., cálculo de regresión por cuadrados mínimos) [41, 42].

Esta se divide en 2 etapas 1) donde la curva se realiza en disolvente y 2) cuando se adiciona placebo y se estudia el efecto matriz, para decir que curva se usará en la cuantificación.

5.7 Estadística

Recolecta, clasifica y se aplica en una amplia variedad de campos. Los métodos estadísticos se dividen en descriptivos e inferenciales; éstos últimos se dedican principalmente a la estimación de parámetros y el contraste de hipótesis. Mientras que, la estadística descriptiva visualiza y resume los datos de manera numérica o gráficamente. Un análisis de éstos es la prueba de normalidad [43 ,44].

5.7.1 Análisis de normalidad

Es útil para visualizar las distribuciones de los datos respecto a lo esperado si procediesen de una distribución normal con la misma media y desviación típica. Además, sirve para la elección de un método estadístico no se basa en cual es mejor si no que se quiere estudiar y cual se adapta a los datos [44, 45].

5.7.2 Prueba Shapiro-Wilk

Esta prueba se emplea para contrastar normalidad cuando el tamaño de la muestra es menor de 50. Para muestras grandes es equivalente al test de Kolmogorov-Smirnov [46].

5.7.3 Prueba Kolmogorov-Smirnov

Permite estudiar si una muestra procede de una población con una determinada distribución (media y desviación típica) y no está limitado únicamente a la distribución normal. Si el valor p de esta prueba es menor que el nivel de significancia (α) elegido, se puede rechazar la hipótesis nula y concluir que se trata de una población no normal [44, 46].

5.7.4 Prueba Kruskal Wallis

Se trata de una alternativa no paramétrica al test ANOVA de una vía.

Asume que la variable tiene una distribución continua y requiere que esté medida en una escala ordinal. Bajo ciertas simplificaciones puede considerarse que el test de Kruskal-Wallis compara las medianas [47].

- H_0 : todas las muestras provienen de la misma población (distribución).
- H_A : al menos una muestra proviene de una población con una distribución distinta.

5.8 Fundamento de Quimiometría

El aumento progresivo en complejidad de la instrumentación analítica permite obtener cada vez un mayor volumen de datos. La conversión de estos datos en información útil ha dado lugar a una disciplina denominada Quimiometría [48].

“The chemometric society, 1975” define que la quimiometría es la disciplina química que utiliza métodos y técnicas matemáticas, estadísticas y de lógica formal para:

- a. Diseñar y seleccionar procedimientos experimentales óptimos.
- b. Extraer la máxima información relevante a partir del análisis de datos.

La quimiometría abarca diversos objetivos:

Filtrados de señales: Pretratamientos de los datos

Los pretratamientos espectrales tienen como objetivo minimizar las contribuciones espectrales no deseadas, simplificando los modelos y mejorando los resultados [48].

Los pretratamientos espectrales más utilizados son:

1. Promedio de los espectros.

Reduce el ruido espectral y se mejora la relación señal/ruido, ya que éste es considerado aleatorio [49].

2. Centrado de los datos.

Se calcula el valor medio de cada variable de la matriz y se resta en cada punto de la columna. El valor medio corresponde al centro del modelo y los valores de todas las variables se encuentran ahora referidos a este centro [49].

3. Auto-escalado de los datos.

Consiste en un centrado seguido de una normalización, es decir, se divide el resultado del centrado por la desviación estándar de la columna [48, 49].

4. Suavizado espectral

Utilizado para reducir matemáticamente el ruido aleatorio e incrementar la relación señal/ruido, mediante cálculos polinómicos de convolución (Savitzky-Golay) o por Transformada de Fourier [48, 49].

5. Variable Normal Estándar (SNV, por sus siglas en inglés)

Se centra y autoescala cada espectro, restando el valor medio de la absorbancia del espectro a los valores de absorbancia de cada longitud de onda y dividiendo por la desviación estándar [48]. Se utiliza principalmente para corregir el efecto de dispersión (scattering) [49].

Métodos de reconocimiento de pautas: Técnicas multivariantes

Es un conjunto de técnicas estadísticas que analizan simultáneamente más de dos variables consideradas aleatorias y están relacionadas de tal forma que sus efectos no puedan analizarse separadamente [45].

Son de gran utilidad para explicar las fuentes de variabilidad de un proceso y reducir dimensionalidad de los datos [46].

El objetivo principal de las técnicas multivariantes es establecer modelos que sean capaces de predecir propiedades de nuevas muestras. Para que estas predicciones sean fiables se han de establecer modelos robustos.

Las técnicas multivariantes pueden clasificarse en dos:

5.8.1 Técnicas No Supervisadas

Es un método de exploración de datos que generalmente son aplicados en primer lugar para tener una imagen visual global de la distribución de las muestras, observar agrupamientos, posibles objetos anómalos o discrepantes (*outliers*), relacionar muestras de similar procedencia y ayudar en la selección de los métodos apropiados para su clasificación. Tienen como principal objetivo la visualización sencilla de las relaciones entre muestras y variables sin necesidad de asignar las muestras a una determinada clase [40].

Entre las más conocidas son Análisis de Componentes Principales (PCA) y Análisis Cluster (CA), y las cuales se abordaron en este trabajo.

5.8.1.1 Análisis de Componentes Principales (PCA)

El análisis de Componentes Principales (PCA) no es un método útil para llevar a cabo una clasificación, sin embargo, podemos extraer información sobre qué variables definen más la dispersión de las muestras e incluso visualizar si las muestras están dispersas en un patrón que revela grupos, ya que pone de manifiesto las relaciones existentes entre las diferentes muestras y la reducción de datos [52].

Es una herramienta que permite condensar la variabilidad presente en una matriz de datos en unos pocos parámetros representativos, denominados componentes principales (PCs) o variables latentes [48].

El PCA debe encontrar componentes principales z_1, z_2, \dots, z_n que sean combinaciones lineales de las variables originales x_1, x_2, \dots, x_n , que describen cada muestra, es decir:

$$z_1 = a_{11}x_1 + a_{12}x_2 + a_{13}x_3 + \dots + a_{1n}x_n$$
$$z_2 = a_{21}x_1 + a_{22}x_2 + a_{23}x_3 + \dots + a_{2n}x_n, \text{ etc.}$$

Los coeficientes a_{11}, a_{12} , etc, se eligen de manera que las nuevas variables, a diferencia de las variables originales, no se encuentren correlacionadas unas con otras [11].

El primer componente principal es la combinación lineal de las N variables que explica la máxima variabilidad de las muestras.

El PCA utiliza dos herramientas de visualización gráfica:

✓ Gráfico de scores: proporciona un mapa de las muestras. Se utilizan para examinar similitudes o diferencias entre muestras, así como para observar pautas anómalas en los datos [48, 53].

✓ Diagrama de *Loadings*: proporciona un mapa de las variables [53].

Los *loadings* son útiles para determinar cuáles son las variables originales más importantes. El estudio visual de los *loadings* es útil para identificar las regiones espectrales, y en consecuencia los compuestos químicos, con mayor importancia en los datos [48].

5.8.1.2 Análisis Cluster (CA)

Es un método para dividir un grupo de objetos en una serie de clases de manera que los objetos similares se encuentren en la misma clase [50]. Para llegar a agrupar los objetos en clases naturales, utiliza el criterio de minimizar la desviación interna de los patrones de un mismo grupo, maximizando, por tanto, la distancia entre los diversos grupos, es decir, el CA lo que hace es comparar entre dos muestras mediante la distancia que hay entre ellas [54].

Existen diferentes expresiones matemáticas para calcular estas distancias [48]:

Distancia Euclídea está definida mediante la siguiente ecuación:

$$d = \sqrt{(x_1 - y_1)^2 + (x_2 - y_2)^2 + \dots + (x_n - y_n)^2}$$

Distancia euclídea al cuadrado: Consiste simplemente en la suma de las diferencias al cuadrado de los valores [51].

$$d = (x_1 - y_1)^2 + (x_2 - y_2)^2 + \dots + (x_n - y_n)^2$$

Distancia Manhattan: Es la suma de las longitudes de las proyecciones del segmento de línea entre los puntos sobre el sistema de ejes. Más formalmente:

$$d_1(p, q) = |p - q|_1 = \sum_{i=1}^n |p_i - q_i| \quad \text{donde } p = (p_1, p_2, \dots, p_n) \text{ y } q = (q_1, q_2, \dots, q_n) \text{ son vectores}$$

Correlación de Pearson: Considerado como una medición de similaridad entre variables. El coeficiente oscila entre -1 y +1 (es un coeficiente normalizado).

Cuanto más próximo esté el coeficiente a -1 o +1, más fuerte es la relación entre las variables [55].

$$\text{Correlación } (x,y) = \frac{\sum z_x z_y}{N - 1}$$

Se consideran dos métodos de aglomeración jerárquicos y los no jerárquicos. En los jerárquicos, un clúster contiene otros clústeres, hasta finalizar en un solo grupo agrupando todos los clústeres. En los métodos no jerárquicos, se decide cuántos grupos al iniciar el análisis (tal y como sucede con el análisis discriminante) [55].

Considerando estos dos tipos de procedimientos para buscar clústeres, existe una gran diversidad de métodos diferentes. La mayoría de los métodos permiten elegir qué medida de similitud o disimilitud emplear para formar los grupos [48, 55].

- *Average linkage*: considera la distancia entre dos grupos y número de objetos respectivamente, como la media de las distancias entre todos los pares de casos en los que cada uno de ellos procede de un grupo (clúster) diferente.
- *Complete linkage* o Vecino más lejano: la distancia entre los grupos es la que determine los dos casos más diferentes, perteneciendo cada caso un grupo diferente.
- *Single linkage* o Vecino más próximo: la distancia entre dos conglomerados o grupos es la distancia entre los dos casos más próximos, perteneciendo cada uno de ellos un grupo distinto.
- *Ward's method*: para cada grupo se calcula la media de todas las variables. Posteriormente, para cada caso, se calcula la distancia euclídea al cuadrado a la media del grupo, esa distancia se suma para todos los casos. En cada paso se agrupan los dos clústeres que producen un menor incremento en la suma total de cuadrados de las distancias en los conglomerados.

La manera más habitual de representar los datos es mediante un dendograma o árbol que consiste en la elaboración de una clasificación jerárquica donde los grandes grupos se dividen en otros más pequeños [48].

5.8.2 Técnicas Supervisadas

También conocidas como de “análisis discriminante”, el modelado se realiza partiendo de un conjunto de datos llamado calibrado (*training*) las cuales se asignan a determinada clase de manera exclusiva, posteriormente se lleva a cabo la validación (test) con el conjunto de datos pequeño [53, 56].

5.8.2.1 Support Vector Machine (SVM, por sus siglas en inglés)

La técnica de SVM crea un hiperplano en el espacio dimensional ilimitado que separa los puntos y maximiza el margen funcional entre dos o más clases diferentes, con un error muy pequeño, de manera que no haya superposición de muestras erróneamente clasificadas, como se aprecia en la **Figura 8** [57].

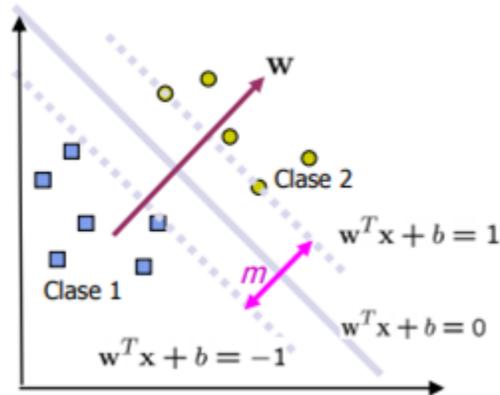


Figura 8. Frontera de decisión de los datos de dos clases diferentes.

Fuente: Las Maquinas de Soporte Vectorial (SVMs) .Scientia et Technica Año XI, No 27, Abril 2005. UTP. ISSN 0122-1701
.Gustavo A. Betancourt. Sitio <https://www.redalyc.org/pdf/849/84911698014.pdf>

El punto de datos de entrenamiento más cercano de cualquier clase se le conoce como margen funcional.

La categoría de margen funcional hace un clasificador lineal binario no probabilístico. Esta técnica es un modelo de aprendizaje supervisado utilizado para la clasificación lineal y no lineal [57].

SVM encuentra el hiperplano óptimo utilizando el producto punto con funciones en el espacio de características que son llamadas kernels. La solución del hiperplano óptimo puede ser escrita como la combinación de unos pocos puntos de entrada que son llamados vectores de soporte [57].

La función kernel, permite una introducción suave de la no linealidad mediante el mapeo de las observaciones originales en un espacio de características de mayor dimensión, que permite la aplicación de un algoritmo lineal para resolver problemas no lineales [57].

El parámetro C tiene un gran impacto en el rendimiento de un modelo. La optimización se convierte en un compromiso entre un amplio margen y una penalización de error pequeño [57].

5.8.2.2 k -Vecino más cercano (k-NN, por sus siglas en inglés)

El modelo de clasificación de los k vecinos más cercanos, prácticamente fija un valor para k, habitualmente pequeño, y el algoritmo computa una instancia d con los datos de calibración, después de esto, el algoritmo selecciona las k instancias de los datos de entrenamiento más cercanas (de acuerdo con la métrica de similitud utilizada) y se asigna la instancia d a la clase más frecuente de entre las k instancias seleccionadas como más cercanas. Así, la métrica de similitud utilizada influye fuertemente en las relaciones de cercanía que se irán estableciendo en el proceso de construcción del algoritmo [58].

La determinación del valor óptimo para k es la parte más importante para la implementación de un método k-NN. De modo que con valores distintos de k podemos obtener resultados también muy distintos [58].

5.8.2.3 Análisis de Componentes Principales y Análisis Discriminante (PCA-DA)

El análisis discriminante es muy similar al PCA. La principal diferencia es que PCA calcula los mejores componentes discriminantes sin previo conocimiento sobre los grupos, mientras que el análisis discriminante calcula los mejores componentes discriminantes para los grupos definidos por el usuario [59].

PCA busca la dirección que muestra la mayor varianza total, mientras que DA maximiza la separación entre los grupos mientras minimiza la variación dentro del grupo [59].

5.8.3 Parámetros de desempeño

Al crear un modelo de clasificación como los ya mencionados, es importante seleccionar las características correctas y evaluar los parámetros de desempeño que son: precisión, sensibilidad, especificidad, y exactitud, los cuales se definen a continuación [60]:

- **Precisión:** Se trata de la capacidad de un modelo para excluir muestras de otras clases en la clase de estudio. Utilizando la relación de la muestra en un conjunto correctamente asignadas y el número total de muestras en el mismo.
- **Sensibilidad:** Capacidad del modelo de reconocer correctamente la pertenencia de las muestras al conjunto correcto.
- **Especificidad:** Es la capacidad del conjunto para rechazar las muestras de otras clases.
- **Exactitud:** Expresa la proporción de las muestras asignadas correctamente.

CAPITULO III

6. METODOLOGÍA

6.1 Muestras Analizadas

Las muestras utilizadas en la presente tesis fueron suministradas por el Consejo Regulador del Tequila (CRT). Los tipos de muestras se describen en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Muestras de tequilas y destilados/licores de agave

Clase	Tequilas		total
	100 % agave	mixtos	
Blancos	30	34	64
Jóvenes	-	9	9
Reposados	27	15	42
Añejos	25	-	25
Extra-añejos	9	-	9
Total	91	58	149
	Destilados de agave	Licores	
	22	13	35
Total			185

Para este estudio los tequilas añejos y extra-añejos son considerados en el mismo grupo. Asimismo, los destilados y licores de agave se ubican en un grupo.

6.2 Equipos y Reactivos

- Equipos
 - Espectrofotómetro Ultravioleta- Visible de doble haz Lambda 35, Perkin-Elmer.
 - Cromatógrafo de líquidos marca Agilent modelo 1100. El cual se compone de bomba cuaternaria, desgasificador de membrana, control de temperatura de la columna, inyector automático y detector UV-Vis.
- Estándares
 - 5-hidroximetil-2 furfural, 99 % (Sigma-Aldrich)
 - Furfural, 99 % (Sigma-Aldrich)
 - 5-metilfurfural, 99 % (Sigma-Aldrich)
 - 2-acetilfurano, 99 % (Sigma-Aldrich)

6.3 Procedimiento experimental

6.3.1 Espectroscopia UV-Vis

- Preparación de solución etanol-agua.

Se prepararon 100 mL de una solución al 40:60 v/v de etanol: agua. Se midieron 40 mL de etanol con una probeta de 100 mL, posteriormente se mezclaron con 60 mL de agua destilada.

Los espectros de absorción se obtuvieron con ayuda del software UV WinLab© (Perkin Elmer, Waltham, MA, E.U.A.), cada 1 nm desde 190 a 700 nm con una celda de cuarzo de 1 mm de paso óptico. Se usó como blanco la solución etanol- agua con proporción 40:60 v/v.

Los datos ya procesados fueron guardados en formato ASCII, compatibles con el programa Excel y posteriormente se realizó la matriz del conjunto de datos.

6.3.2 Análisis por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución

- Preparación de la curva de calibrado.

Se prepararon soluciones en nueve niveles de concentración 0.1, 0.5, 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25 mg/L diluyendo volúmenes apropiados de la solución estándar concentrada en matraces volumétricos de 5 mL con solución 25 % metanol. Cada nivel se preparó por triplicado. (Ver anexo III).

- Preparación de muestra

Se tomaron 500 μ L de muestra con una micropipeta para depositarlos en un matraz volumétrico de 1 mL aforado con agua desionizada. Cada muestra fue preparada por triplicado.

- Condiciones cromatográficas

La separación cromatográfica se realizó con una columna Eclipse XDB-C18 de medidas 4.6 x 250 mm y diámetro de partícula de 5 μ m, como fase móvil metanol (A) y agua (B) en un gradiente lineal. Las condiciones se presentan en la **Tabla 2**. El tiempo total de análisis fue de 20 min. La columna se mantuvo a 40 °C. El volumen de inyección fue 20 μ L. Los analitos se monitorearon a una longitud de onda de 280 nm.

Tabla 2. Gradiente de la fase móvil utilizado para la separación.

Tiempo (min)	% A	% B	Flujo (mL/ min)
0.0	10.0	90.0	1.0
10.0	70.0	30.0	1.0
15.0	70.0	30.0	1.0
Tiempo de equilibrio (min)	5		

El agua desionizada usada como fase móvil se filtró diariamente con una membrana de 0.45 µm de diámetro de poro. Ambas fases móviles fueron sometidas a desgasificación con ultrasonido en baño de agua antes de su uso.

La adquisición y procesamiento de los datos cromatográficos se hizo a través del software Chemstation de Agilent.

6.4 Análisis quimiométrico

- Construcción de matrices

Con los datos en Excel se construyó la matriz de los resultados en forma de tabla. Dicha matriz se nominó con datos importantes para la identificación de esta; los conjuntos de datos se colocaron en 1 columna, la clave del tequila y en renglones las variables (longitud de onda o tiempo, según sea el caso), el resultado se representa en la **Figura 9 a) y b)**. A partir de dicha matriz es posible tratar los datos en el software correspondiente con sus debidas modificaciones según la técnica.

Created by Marisol Gutierrez y Ana Laura Vega
 Valores de absorbancia de los tequilas CRT en Espectrofotometro UV-Vis Lab 10
 Brutos
 15 de Octubre del 2018
 07 de marzo del 2019
 28 de Agosto del 2019 (Actualizada)

# %Etanol	700	699	698	697	696	695	694	693	692	691	690	689	688	687	686
28 DA 01	0.00098	0.00103	0.00103	0.00094	0.00101	0.00102	0.00101	0.00105	0.00099	0.00109	0.00108	0.00101	0.00105	0.00112	0.0011
26 DA 02	6.00E-05	-8.00E-05	-6.90E-05	-6.00E-05	8.00E-05	-2.00E-05	0	6.90E-05	-6.90E-05	6.00E-05	-3.00E-05	-0.00014	-8.00E-05	-2.00E-05	-6.90E-05
30 DA 04	0.00042	0.00052	0.00044	0.00031	0.00042	0.00042	0.00042	0.00036	0.00047	0.00039	0.00055	0.00041	0.00048	0.00042	0.0003
28 DA 05	-0.00016	-0.00022	-0.00023	-0.0003	-0.00017	-0.00019	-0.00021	-0.00027	-0.00024	-0.00021	-0.00012	-0.00039	-0.00027	-0.00022	-0.0002
38 DA 06	-0.00038	-0.00038	-0.00045	-0.00043	-0.00032	-0.00046	-0.00041	-0.00046	-0.00043	-0.00053	-0.00047	-0.00053	-0.00048	-0.00048	-0.0004
34 DA 08	0.00038	0.00037	0.00044	0.00035	0.00037	0.00039	0.00034	0.00038	0.00034	0.00035	0.00041	0.00032	0.00037	0.00047	0.0004
28 DA 10	0.00036	0.00036	0.00032	0.00031	0.00033	0.00032	0.00028	0.00029	0.00039	0.00038	0.00033	0.00021	0.00029	0.00041	0.0004
34 DA 12	0.00029	0.00032	0.0003	0.0003	0.00029	0.00025	0.00023	0.00028	0.00019	0.00033	0.0003	0.00018	0.00028	0.00031	0.0003
28 DA 15	0.00107	0.00111	0.00106	0.00105	0.001	0.00113	0.00107	0.00106	0.00102	0.00116	0.00115	0.00109	0.00111	0.00116	0.0011
28 DA 16	5.00E-05	0.00012	0.00013	4.00E-05	2.00E-05	0.0001	0	3.00E-05	2.00E-05	6.90E-05	0.00012	-5.00E-05	2.00E-05	0.0001	0.0001
28 DA 20	0.00026	0.00028	0.00034	0.00021	0.0002	0.00018	0.00019	0.00019	0.00019	0.0002	0.00028	0.00017	0.00017	0.00025	0.0003
26 DA 21	0.00026	0.00027	0.0002	0.00016	0.00026	0.00024	0.00028	0.00035	0.00024	0.00026	0.00034	0.00013	0.00018	0.00029	0.0002
30 DA 22	-0.00046	-0.00048	-0.00039	-0.00055	-0.00032	-0.00045	-0.00046	-0.00045	-0.00043	-0.00045	-0.00044	-0.00056	-0.00053	-0.00045	-0.0004

Figura 9 a). Matriz utilizada para el análisis quimiométrico con datos UV-Vis.

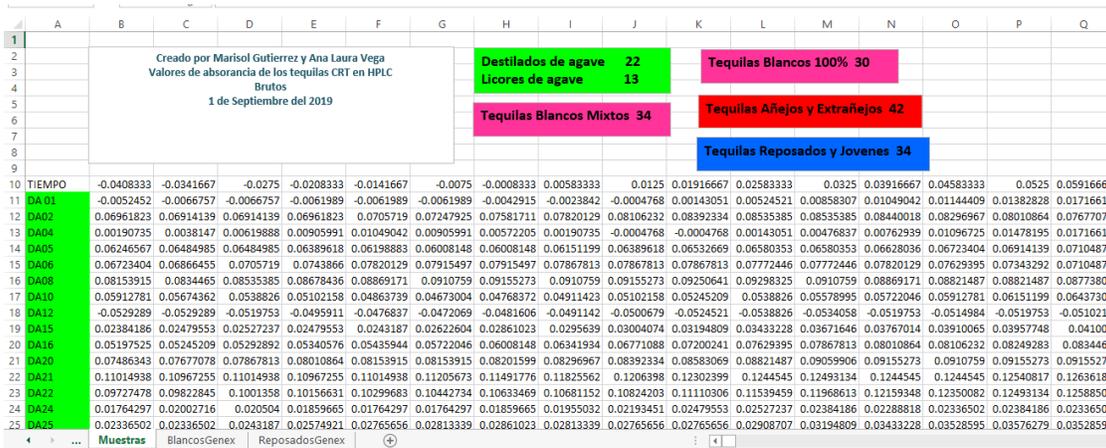


Figura 9 b). Matriz utilizada para el análisis quimiométrico con datos de HPLC.

- Identificación de las muestras

Para identificar a las muestras en los modelos quimiométricos, se les asignó una clave, un color y un símbolo, descritos en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Simbología de las muestras utilizadas.

Categoría	Clave		Símbolo y color Software Genex®.		Símbolo y color Software Matlab®	
			Calibración	Validación	Calibración	Predicción
Destilado/licor de Agave	DA					
Tequila Blanco*	TB	TMB				
Tequila Reposado*	TR	TMR				
Tequila Añejo y extra-añejo	TA					

*En caso de pertenecer a la clase de tequilas mixtos se agrega una “M” a la clave, para identificarlo.

- Software GenEx© (MultiDAnalysis AB, Gotemburgo, Suecia)

Este software se utilizó para realizar los modelos quimiométricos de Análisis de Componentes Principales (PCA), Análisis Cluster (CA) y Support Vector Machines (SVM).

- Software Matlab© (MathWorks, EUA.)

Con este software se trabajaron los modelos de las técnicas supervisadas: PCA-DA y KNN.

6.5 Análisis estadístico

Software: Statgraphics XVIII ®

Para la curva de calibración: análisis de varianza (ANOVA) y el método de mínimos cuadrados.

Para el estudio de las muestras: análisis de normalidad con la Prueba Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov, posteriormente se realizó una Prueba Kruskal Wallis para estimar diferencias estadísticamente significativas de los datos obtenidos del contenido furánico entre los tequilas auténticos y destilados de agave, con un nivel de confianza al 95 %.

CAPITULO IV

7. RESULTADOS Y ANÁLISIS PRIMERA PARTE

ANÁLISIS DE LOS MÉTODOS

7.1 Análisis espectral UV-Vis

En la **Figura 10** se presentan los espectros de absorción obtenidos en la región de 190 a 700 nm; la banda de absorción de los tequilas auténticos es significativamente más intensa con respecto a prácticamente todos los destilados de agave.

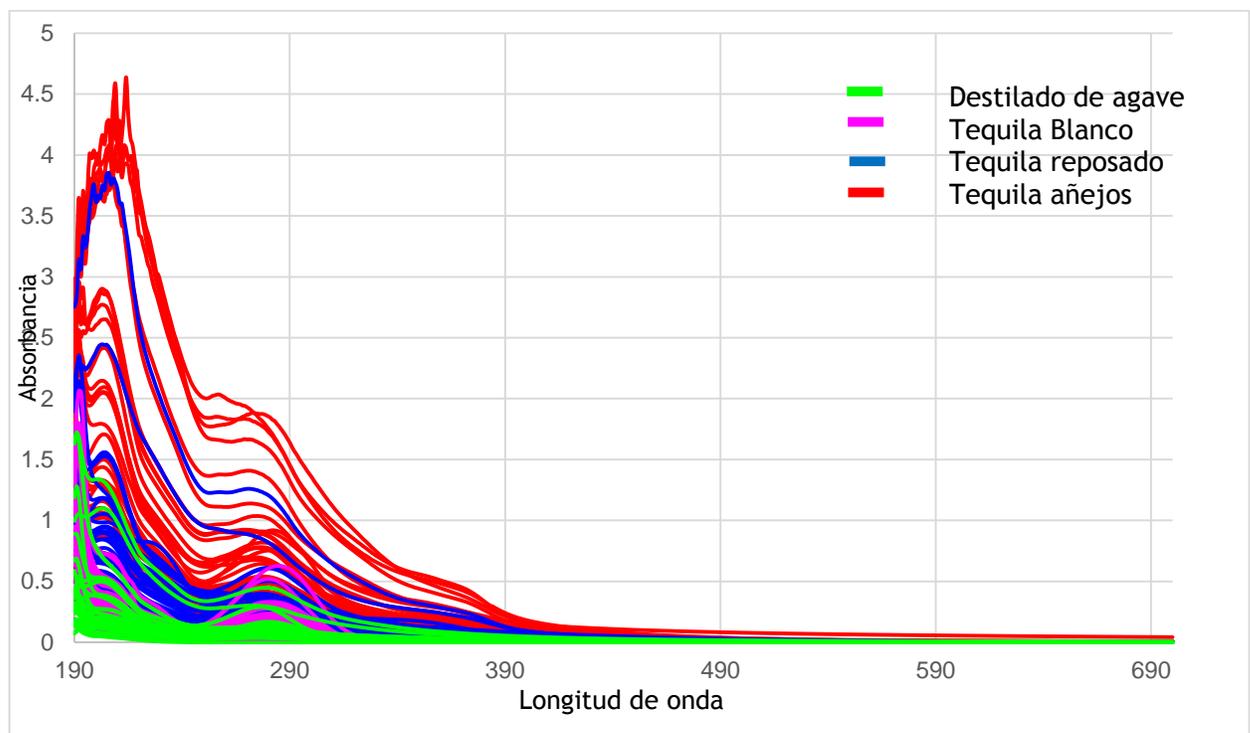


Figura 10. Espectros de absorción UV-Vis de 140 tequilas auténticas (64 tequilas blancos, 42 reposados, 25 añejos y 9 extra-añejos) y 35 destilados de agave de 190 a 700 nm.

Con el fin de mostrar las tendencias de una manera explícita, en la **Figura 11** se colocó un espectro representativo para cada clase de tequila y un destilado de agave. Es posible observar el cambio de amplitud de las bandas; en el caso de los tequilas auténticos, conforme aumenta el tiempo de añejamiento, la absorbancia es mayor, ya que el número de componentes orgánicos se incrementa.

Se observan máximos en 192 nm, 280 nm, 370 nm; tales bandas se atribuyen a moléculas con estructuras insaturadas. En la región del ultravioleta cercano salen a relucir componentes orgánicos que se generan en el proceso de obtención de estas bebidas alcohólicas, en especial en las etapas de cocción, fermentación y en algunos casos de añejamiento. Cada marca comercial de las bebidas tiene una mezcla característica de estos compuestos orgánicos (furfural, 5-metilfurfural, 2-acetilfurano) que dan lugar a la banda ancha en la región de 250 a 400 nm cuyo máximo está alrededor de 280 nm [61]. Por otro lado, en la región del visible en la zona comprendida de 380 a 480 nm absorben los colores violeta-azul que corresponde a los colores observados en la mayoría de los destilados de agave y bebidas añejadas.

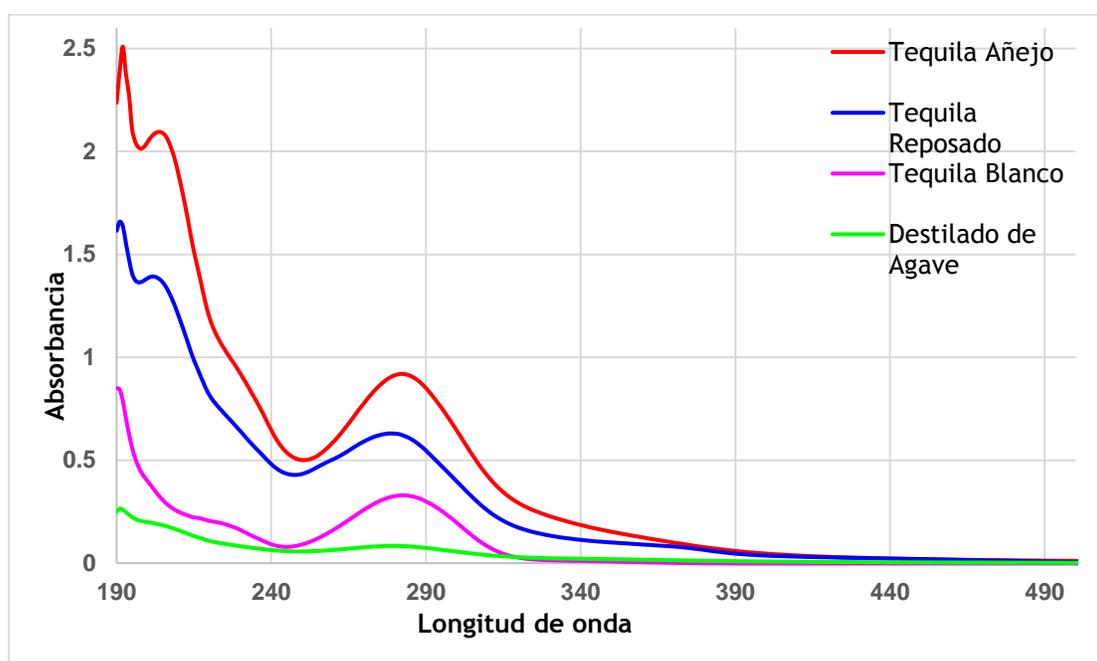


Figura 11. Espectros típicos de cada tequila auténtico (tequila blanco, reposado y añejo) y un destilado de agave de 190 a 500 nm.

7.2 Análisis cromatográfico

Dado que los compuestos furánicos contribuyen en gran medida a la banda característica de 280 nm del espectro UV-Vis [61]. Se analizaron 4 furanos: el 5-hidroximetilfurfural (5-HMF), el furfural (FUR), 2-acetilfurano (2-AF) y 5-metilfurfural (5-MF) en tequilas auténticas y en destilados de agave por HPLC.

7.2.1 Adecuación del método Cromatográfico

Inicialmente fue necesario un procedimiento de adecuación para el buen desempeño del método cromatográfico, así que se evaluó la elución de los analitos con una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 15 cm (5 μ m, 4.6 x 250 mm), T=40 °C, flujo 1 ml/min y una proporción metanol: agua al 25 % en modo isocrático; es decir que el poder de elución de la fase móvil se mantuvo constante durante el análisis. Esto debido a que los analitos poseen similar polaridad, según la propiedad de las moléculas de estudio como se mencionó en el capítulo dos.

Este procedimiento resultó adecuado para las primeras mediciones, pero conforme se midieron más muestras, los picos empezaron a perder eficacia, como se muestra en la **Figura 12**, se presentaron problemas de simetría, como picos ensanchados y/o dobles lo que se atribuye a interacciones secundarias de analitos con la fase estacionaria, debido posiblemente a residuos acumulados provenientes de la complejidad de las muestras, sobre todo de las muestras de destilados de agave y tequilas añejados.

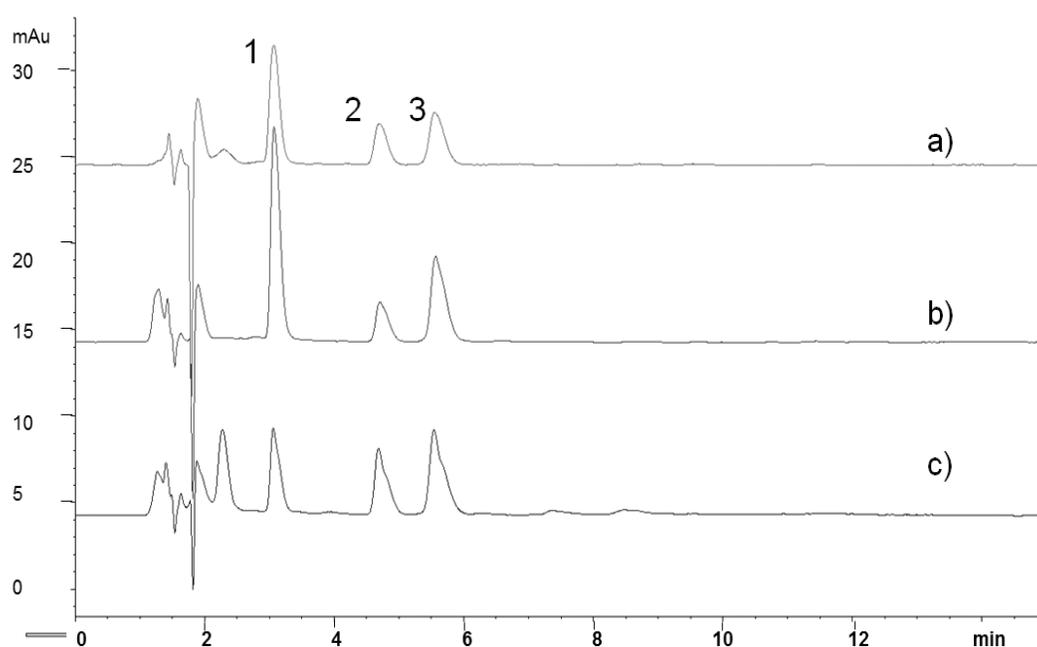


Figura 12. Cromatogramas HPLC de muestras de Tequilas Auténticos en mediciones consecutivas: a) Tequila mixto joven 8 (TMJ 8), b) Tequila mixto joven 7 (TMJ 7) y c) Tequila mixto blanco 11 (TMB 11). (1) FUR (2) 2-AF (3) 5-MF. Condiciones: columna Zorbax Eclipse XDB-C18 15 cm (5 μ m, 4.6 x 250 mm), T=40 °C, flujo 1 mL /min, vol. Iny. 20 μ L, isocrático 25 % metanol. λ = 280 nm.

Por lo tanto, se modificaron las condiciones cromatográficas, se utilizó una columna Eclipse XDB- C18 15 cm (5 μ m, 4.6 x 250 mm), T=40 °C, flujo 1 mL/min, vol. Iny. 20 μ L, se empleó como fase móvil metanol: agua, con gradiente lineal: 0 min-10 % metanol, 10 min-70 % metanol, con 20 min de análisis completo; de esta forma se eluyen otros compuestos presentes en las muestras inyectadas. Los resultados fueron favorables; los picos están bien resueltos y la señal de cada analito corresponde con la señal de referencia. Esto se repitió con todas las muestras. En la **Figura 13**. se presentan los cromatogramas de mediciones consecutivas obtenidas bajo el sistema cromatográfico optimizado.

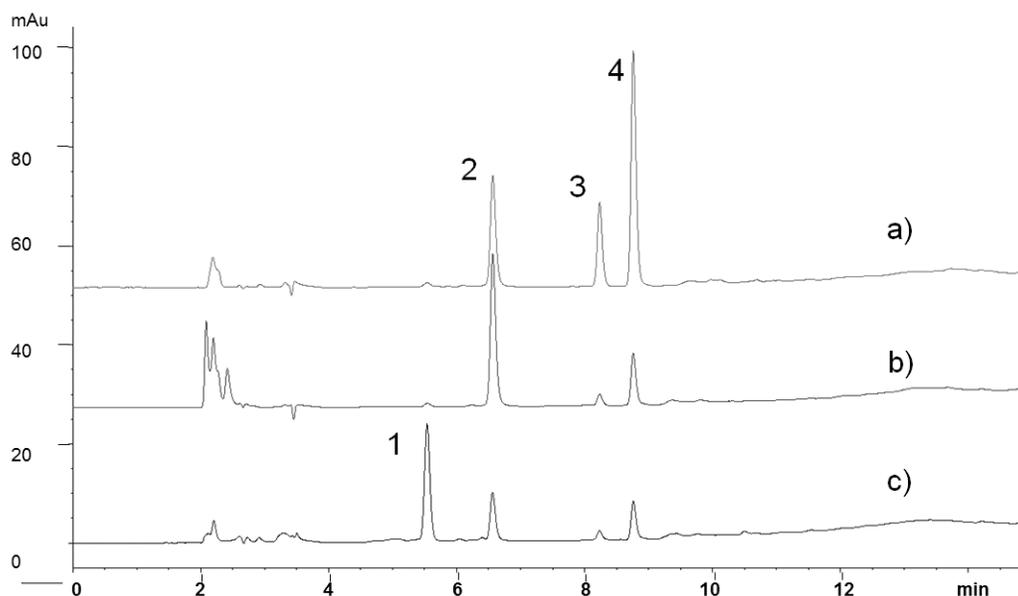


Figura 13. Cromatogramas HPLC de muestras de Destilados de agave en mediciones consecutivas: a) Licor de agave 18 (LA 18) b) Destilado de agave 20 (DA 20) c) Destilado de agave 25 (DA25). (1) 5-HMF (2) FUR (3) 2-AF (4) 5-MF. Condiciones: columna Eclipse XDB- C18 15 cm (5 μ m, 4.6 x 250 mm), T=40 °C, flujo 1mL/min, vol. Iny. 20 μ L, gradiente lineal: 0 min 10 % A, 10 min 70 % A. λ = 280 nm.

La siguiente **Figura 14**. corresponde a los cromatogramas de una solución estándar a 5 mg/L que contiene los 4 compuestos furanos y dos muestras de tequilas auténticos para demostrar la concordancia de cada pico. El primer compuesto que se eluye es el 5-hidroximetilfurfural con un tiempo de retención de 5.52 min, después el furfural con un tiempo de retención de 6.53 min, posteriormente el 2-acetilfurano aparece a 8.21 min y por último el 5-metilfurfural que aparece a los 8.73 min.

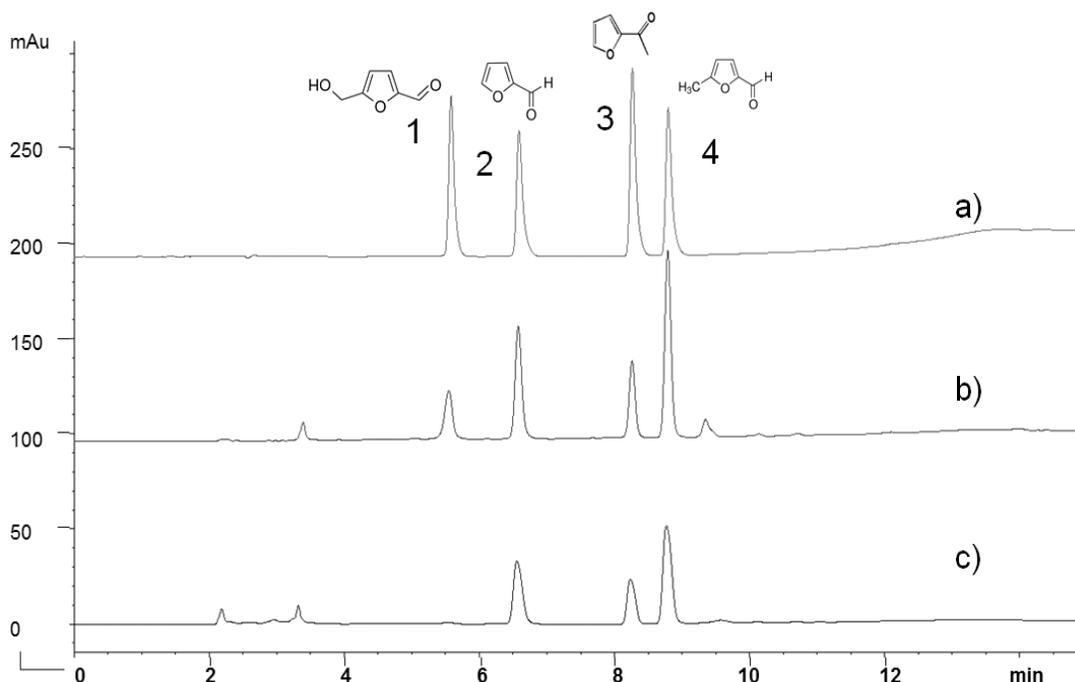


Figura 14. Cromatogramas HPLC a) Solución estándar de 5 mg/L, b) Tequila reposado, c) Tequila joven. (1) 5-HMF (2) FUR (3) 2-AF (4) 5-MF. Condiciones: columna Eclipse XDB- C18 15 cm (5 µm, 4.6 x 250 mm), T=40 °C, flujo 1 mL/min, vol. Iny. 20 µL, gradiente lineal: 0 min 10 % A, 10 min 70 % A. λ= 280 nm.

7.2.1.1 Repetibilidad del método

La repetibilidad inter-día del método se evaluó a partir de la preparación de 2 niveles de concentraciones: inferior y superior, medidas tres veces en tres días diferentes. Como vemos en la **Tabla 4**, las variaciones en los datos son menores al 3 % (parámetro óptimo), y por lo tanto son aceptables.

Tabla 4. Resultados de repetibilidad inter-día para los furanos

Analito	Concentraciones (mg/L)	Coefficiente de variación (%)
5-HMF	1	1.81
	10	2.35
FUR	3	2.4
	15	1.92
2-AF	3	2.91
	15	1.47
5-MF	1	2.87
	10	2.30

Ver anexos V a VIII. Resultados para la repetibilidad inter-día.

7.2.1.2 Linealidad de la curva de calibración

Se realizó una curva de calibración en las condiciones cromatográficas óptimas para cada analito en un intervalo de 0.1 a 25 mg/L, con 9 niveles de concentración con 3 réplicas. Se estudiaron los parámetros de linealidad, resumidos en la **Tabla 5**, con análisis estadísticos; por el método de mínimos cuadrados se obtuvo la ecuación de la recta de cada compuesto, con un coeficiente de correlación $r > 0.99$, valor muy cercano a la unidad, por lo que existe una correlación lineal entre las dos variables dentro del intervalo de trabajo. En la tabla de ANOVA se obtuvo un valor-P menor que 0.05, que corrobora la relación estadísticamente significativa entre área de cada compuesto furano y la concentración (mg/L) con un nivel de confianza del 95.0 %.

Tabla 5. Parámetros de linealidad con intervalo de confianza al 95 %.

Analito	Intercepto (n=3)	Pendiente	Homocedasticidad	r^2
5-HMF	6.72±45.18	183.038 ±3.76	cumple	0.998
FUR	-5.55±46.99	123.175±3.90	cumple	0.994
2-AF	-5.19±49.20	131.292±4.09	cumple	0.995
5-MF	14.64±24.87	100.32±2.06	cumple	0.998

Ver en anexo IX al XII. Gráficos de linealidad y homocedasticidad

7.2.1.3 Análisis de efecto matriz

Este análisis tiene gran importancia en la mayoría de los estudios analíticos que involucran muestras de composición compleja que requieran un pretratamiento para la limpieza de interferentes y la concentración de los analitos de interés. El efecto matriz provoca un error sistemático en el recobro generado por la variación de la respuesta instrumental en la muestra problema.

En este caso es importante hacer notar que la complejidad química de un tequila es muy diversa ya que depende del proceso de elaboración propio de cada Casa Tequilera (tipo de agave, tiempo de añejamiento, tipo de barrica, entre otras). La manera de realizarlo sería por el método de adiciones patrón donde se agregaría una concentración conocida del estándar a una muestra problema a tres niveles de concentración.

Vale la pena mencionar que no hay evidencia en la literatura de que existan componentes que generen un efecto matriz en la determinación de furfurales mediante el análisis directo de la muestra de acuerdo con Muñoz-Muñoz [62]. Aún

con la aplicación de un método de pre-concentración como la extracción en fase sólida, no se demostró un efecto matriz en esta determinación [11].

Por lo anterior, se puede asumir que los recobros en promedio son cercanos a 100 % y los analitos se pueden determinar con una curva de calibración por estándar externo.

7.2.1.4 Límites de detección y cuantificación

Se calcularon los límites para tener la fiabilidad de que el analito se detecta y cuantifica correctamente bajo las condiciones del método, sin error sistemático. En la **Tabla 6** se muestran los valores para cada compuesto furánico, los cuales se obtuvieron a partir de la relación señal/ruido.

Tabla 6. Resultados de límite de detección y límite de cuantificación.

	5-HMF	FUR	2-AF	5-MF
LD (mg/L)	0.03	0.05	0.02	0.02
LQ (mg/L)	0.08	0.16	0.06	0.08

7.2.5 Análisis de muestras problema

La **Figura 15** presenta ejemplos de cromatogramas obtenidos para cada tipo de muestra analizado. Todos muestran los 4 picos correspondientes a los cuatro furanos antes mencionados, a excepción de los tequilas blancos, en el cual sólo se detectan 3 (FUR, 2-AF, 5-MF), por lo que, cualitativamente el 5-HMF fue útil para diferenciar entre tequilas blancos (TB) y destilados de agave (DA). En los tequilas reposados y añejos hay presencia de un quinto pico que aparece a 9.3 min, se podría atribuir a compuestos que aparecen en la etapa de añejamiento puesto que las muestras son sometidas a esta etapa. Al tratarse de un análisis en fase reversa los analitos no polares que se intuye están presentes podrían ser el metil-2-furoato [12].

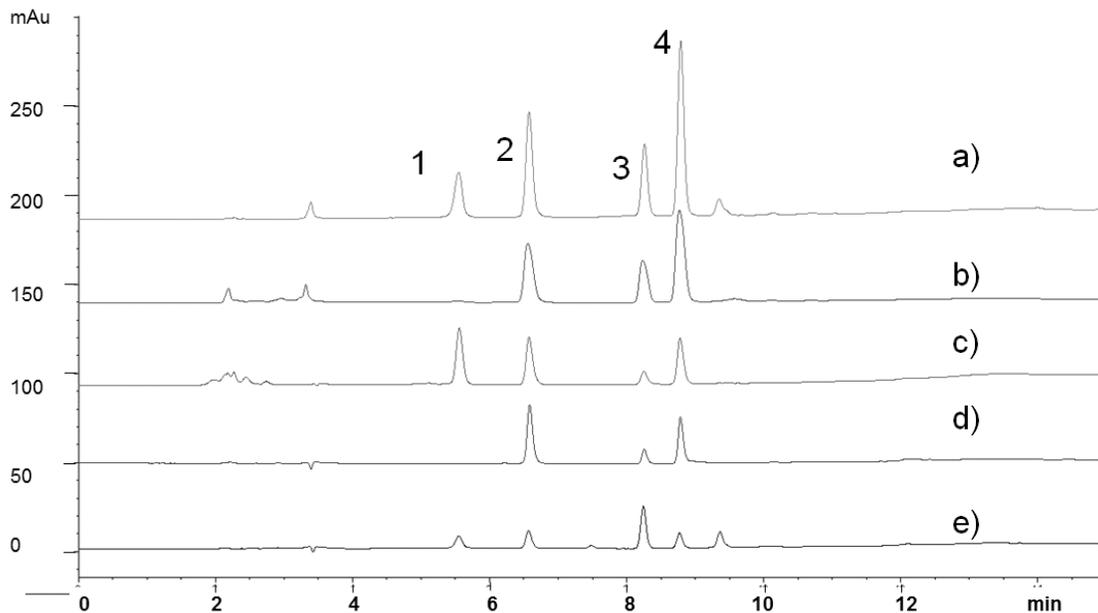


Figura 15. Cromatogramas HPLC de cada tipo de muestra. a) Tequila reposado, b) Tequila joven, c) Destilado de agave, d) Tequila blanco, e) Tequila añejo. (1) 5-HMF (2) FUR (3) 2-AF (4) 5-MF.

Condiciones: columna Eclipse XDB- C18 15 cm (5 μ m, 4.6 x 250 mm), T=40 °C, flujo 1 ml/min, vol. Iny. 20 μ L, gradiente lineal: 0 min 10 % A, 10 min 70 % A. λ = 280 nm.

SEGUNDA PARTE
CUANTIFICACIÓN DE FURANOS

7.3 Prueba de normalidad

Posterior al análisis cromatográfico y demostrada la confiabilidad de la curva de calibración, se cuantificaron los compuestos furánicos; a los datos obtenidos se les realizó la prueba de normalidad Shapiro Wilk a DA, TR y TA, y la prueba Kolmogorov-Smirnov para TB debido al número de muestras. Los resultados se observan en la **Tabla 7**, el valor de P es menor a 0.05 en todos los casos, a excepción del TA en FUR y TR en 2-AF, lo cual indica que los datos no tienen una distribución normal, por lo tanto se optó por utilizar estadística no paramétrica para la representación de los datos.

Tabla 7. Valor-P de prueba de normalidad.

Prueba	Shapiro Wilk			Kolmogorov -Smirnov
	DA (35)	TR (42)	TA (34)	TB (64)
Compuesto	5-HMF			
Valor-P	2.93x10 ⁻¹⁰	1.56x10 ⁻⁸	6.61x10 ⁻⁹	
Compuesto	FUR			
Valor-P	4.37x10 ⁻⁹	2.45x10 ⁻⁸	0.25	0.00
Compuesto	2-AF			
Valor-P	1.01x10 ⁻⁷	0.11	0.04	0.03
Compuesto	5-MF			
Valor-P	4.37x10 ⁻⁹	0.0	0.00	0.04

Ver gráficas en los anexos del XIII al XVI.

7.4 Cuantificación de 5-hidroximetilfurfural, furfural, 2-acetilfurano y 5-metilfurfural en destilados de agave y tequilas auténticos.

Como los datos no siguieron una distribución normal, estos se representaron con la mediana y su intervalo correspondiente, para contar con un panorama adecuado de los contenidos de furfurales en cada bebida alcohólica. En la **Tabla 8** se observa que en todos los casos el destilado de agave es la bebida que contiene menor contenido de furfurales; el furfural es el analito de mayor concentración en todas las bebidas analizadas.

Tabla 8. Concentración de furanos en muestras de destilados de agave y tequilas auténticos suministrados por el Consejo Regulador del Tequila.

Tipo de muestra (n)	DA (35)	TB (64)	TR (42)	TA (34)	Mediana General (mg/L)
Compuesto	5-HMF (mg/L)				
Mediana	0	*ND	0.24	0.46	0.24
mínimo	0	*ND	0	0	
máximo	2.95	*ND	3.37	8.65	
Compuesto	FUR (mg/L)				
Mediana	0.87	6.03	3.28	10.61	4.66
mínimo	0	0.37	0.37	1.07	
máximo	9.48	64.23	18.95	22.54	
Compuesto	2-AF (mg/L)				
Mediana	0.28	1.47	2.03	2.74	1.75
mínimo	0	0.30	0.32	0.34	
máximo	1.59	9.52	4.64	7.38	
Compuesto	5-MF (mg/L)				
Mediana	0.46	4.94	3.24	9.46	4.09
mínimo	0	0	0	0.69	
máximo	6.88	40.84	16.57	33.88	

*ND= no detectado, *<LC= límite de cuantificación.

Al observar el contenido de la **Tabla 8**, se planteó la siguiente pregunta: ¿Las concentraciones de cada furfural son similares en tequilas y diferentes en destilados de agave? de ser así, esta podría ser una razón química y estadísticamente importante para diferenciarlos.

Para conocer la respuesta se llevó a cabo un análisis de medianas con la prueba Kruskal Wallis; el resultado del valor P se muestra en la **Tabla 9** y nos indica que, para todos los casos, hay poca probabilidad de que las medianas sean similares con un nivel del 95.0 % de confianza.

Tabla 9. Valor-P de la prueba de Kruskal-Wallis para cada analito.

Compuesto	5-Hidroximetil furfural	Furfural	2- acetil furfural	5-metil furfural
Valor-P	8.77×10^{-12}	6.01×10^{-12}	0.00	7.94×10^{-11}

Para identificar la bebida que determina la diferencia es necesario observar la caja y bigotes de la **Figura 16**; si las muescas se traslapan, significa que no existe diferencia significativa entre ellas. En la **Figura 16 (a)** para 5-hidroximetilfurfural únicamente se sobreponen las muescas de TR y TA, lo que quiere decir que no hay diferencia entre estas pero si entre los tequilas auténticos y los destilados de agave; en los DA el bigote derecho desaparece, puesto que, la concentración de 5-HMF de la mayoría de las muestras están alrededor de cero.

En la **Figura 16 (b)** ninguna muesca se sobrepone, siendo la diferencia significativa para todas las bebidas alcohólicas. La bebida con mayor concentración de FUR es una muestra de los tequilas blancos. Los tequilas añejos no mostraron datos fuera del rango.

La **Figura 16 (c)** claramente muestra el traslape de las muescas en todos los tequilas auténticos, pero los destilados de agave marcan la diferencia. Los tequilas reposados no mostraron datos fuera del rango.

Para la **Figura 16 (d)**, se observa que las muescas de los tequilas blancos y reposados se sobreponen; sin embargo, ningún tequila se sobrepone con los destilados de agave, indicando la diferencia; por la distribución de la caja de la mayoría de las bebidas (a excepción de TR), podemos decir que el contenido de 5-MF se agrupa a concentraciones mayores. Los tequilas reposados no mostraron datos fuera del rango.

En la mayoría se observan puntos fuera de las cajas los cuales corresponden a muestras con contenidos altos que sobrepasan el nivel máximo y debido a la variabilidad de las muestras no es posible considerarlas anómalas.

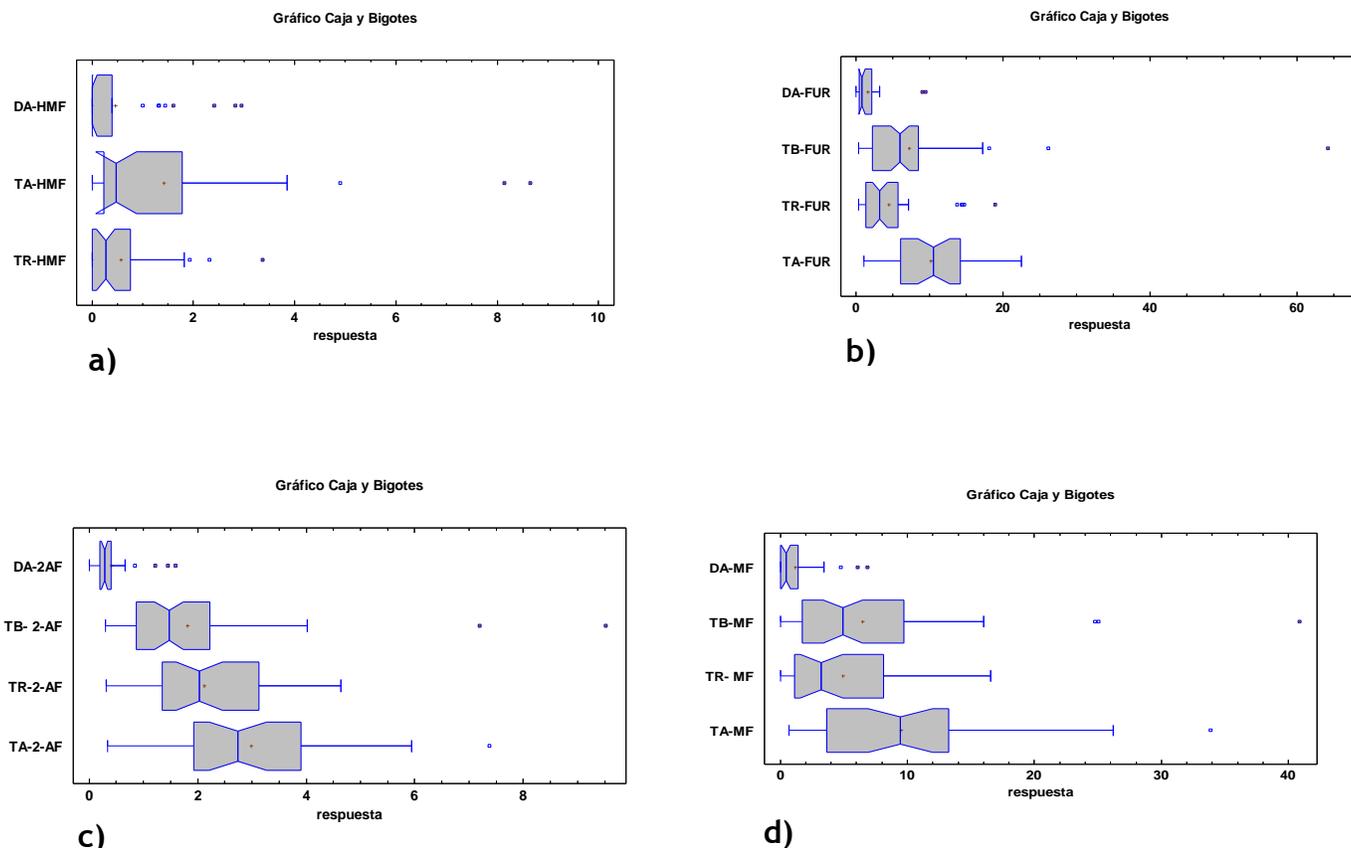


Figura 16. Caja y bigotes con muesca de muestras de tequilas auténticos y destilados de agave. a) 5-HMF b) Furfural c) 2-acetilfurano d) 5-metil furfural.

7.5 Contenido de Furfural de acuerdo con la NOM-006

Como se mencionó en los antecedentes, la NOM-006-SCFI-2005 [2] regula el contenido de únicamente el furfural, no puede rebasar los 4 mg/100 mL de alcohol anhidro. En la Figura 17 se encuentra el porcentaje de bebidas analizadas que cumplen con la NOM, el 100 % de los tequilas reposados cumplen con la NOM-006.

La razón por la que la NOM-006 regula estos compuestos es por efecto en la salud de los consumidores, cuyo efecto se asocia con la generación de adenomas y carcinomas hepatocelulares [62].

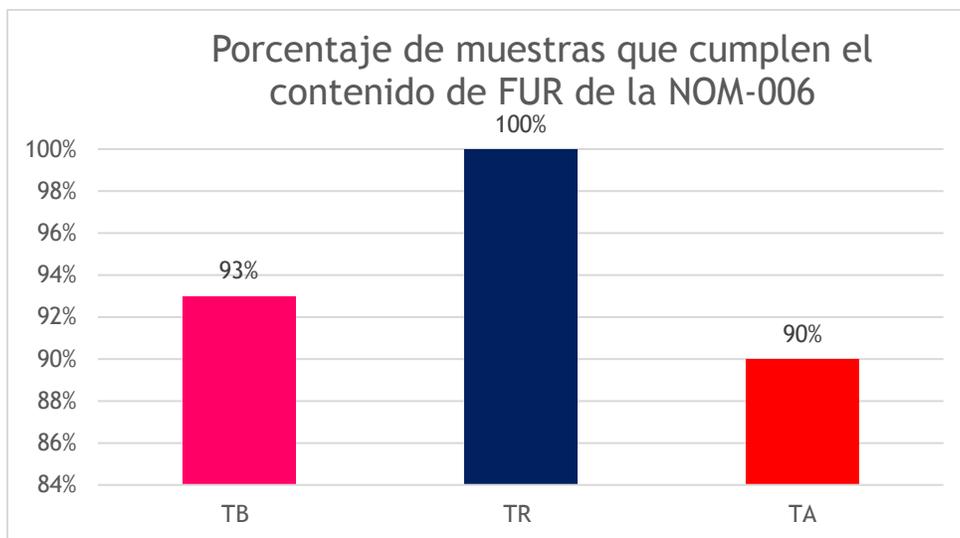


Figura 17. Gráfico de barras para furfural, del porcentaje de muestras que cumplen el contenido de FUR de la NOM-006.

Asimismo, algunos artículos mencionan que a mayor cantidad de los compuestos furánicos menos eficiencia hay en la fermentación de los jugos [63].

7.6 Comparación entre los métodos UV-Vis y HPLC

A continuación, se comparan los resultados obtenidos por las dos técnicas analíticas, HPLC y UV-Vis. La **Figura 18 a)** muestra el cromatograma de los furfurales de un tequila de cada clase y un destilado, mientras que la **Figura 18 b)** presenta sus espectros correspondientes. Se puede observar que la altura de los picos se incrementa en proporción con la intensidad de la banda ancha ($\lambda_{\max} \sim 280$ nm) de los espectros, es decir, la altura del pico y la intensidad de la banda aumenta a medida que la concentración de los compuestos furánicos aumenta. Esto se debe a que mayor grado de maduración de estas bebidas, mayor es el número y contenido de compuestos furánicos. En el caso de los tequilas, se puede constatar en la **Figura 18 a)** que a medida que el tequila es más añejo, el número y la intensidad de los picos cromatográficos aumenta y así mismo el ancho de la banda de espectro.

En la **Figura 18 b)**, para las bebidas añejadas, se observan picos que eluyen en un tiempo mayor de 9 min, los cuales en la presente tesis no fueron identificados, aunque el CONACyT reconoce que las bebidas con proceso de maduración contienen marcadores fenólicos que los diferencian del resto; además, se tiene conocimiento de que la industria de las bebidas alcohólicas tiene permitido añadir colorante caramelo o bien existe la presencia de extractos de roble a causa del uso de barricas de roble. Algunos de los compuestos posiblemente presentes serían: vainillina y siringaldehído [12], que efectivamente se forman en el reposo y/o envejecimiento de la bebida que en tequilas añejos abundan.

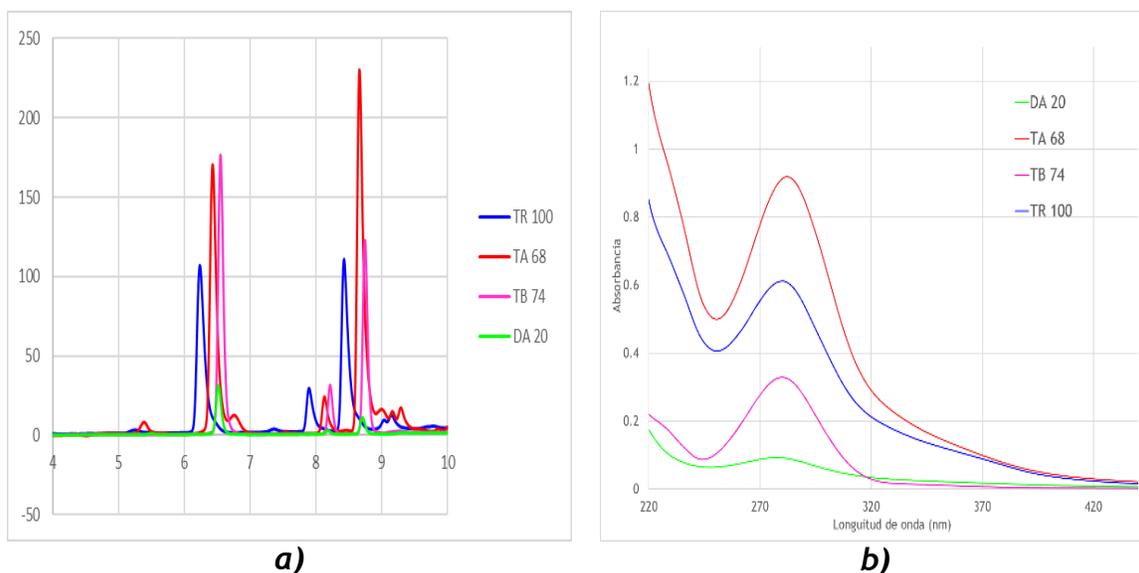


Figura 18. Representación de resultados de cada método para cada tipo de muestras (DA 20, TB 74, TR 100 y TA 68).
 a) Cromatograma con la separación de los diferentes furfurales b) Espectro UV-Vis de 220 a 440 nm.

En la industria siempre se busca un método analítico que permita la obtención de resultados rápidos y confiables; particularmente en la industria de bebidas alcohólicas se sigue estrictamente la NOM-006-SCFI-2005 [2]; sin embargo, resulta buena opción llevar a cabo un análisis discriminante para identificar las bebidas destiladas reguladas como los tequilas y aquellas que no lo están como los destilados de agave utilizados en este trabajo.

Por otro lado, como se había mencionado previamente, la generación de compuestos furánicos se originan a través de la reacción Maillard durante el proceso de cocción de las cabezas de agave para producir azúcares fermentables [62].

La **Figura 19** presenta las concentraciones de los compuestos furánicos vs la absorbancia máxima a 280 nm para las diferentes clases de tequila y destilados de agave. Se puede observar que esta absorbancia guarda una relación directa con las clases de tequila y destilados de agave. La intensidad de esta banda es mayor en todas las clases de los tequilas en comparación con los destilados, es decir, la concentración de furanos es considerablemente menor en comparación con aquéllas de los tequilas auténticos.

Al comparar los contenidos entre las 3 clases de tequilas, se puede constatar que el 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) no se detectó en los tequilas blancos, mientras que 5-metilfurfural (5-MF) y el furfural (FUR) son compuestos predominantes en todas las clases de tequilas.

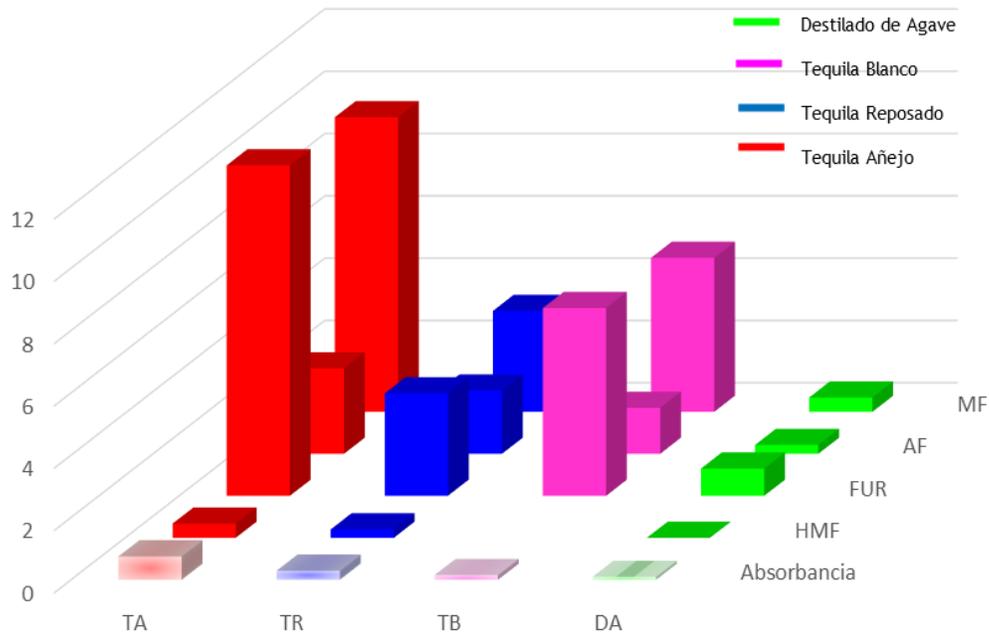


Figura 19. Gráfico comparativo. Clases de tequila y destilados de agave en función de la concentración en mg/L de furanos y UA=Absorbancia a 280 nm. 5-MF=5-metilfurfural, 2-AF=2-acetilfurano, FUR= furfural, 5-HMF=5-Hidroximetilfurfural.

TERCERA PARTE
ANÁLISIS QUIMIOMÉTRICO

7.7 Análisis quimiométrico UV-Vis

Se realizó el análisis quimiométrico con los datos obtenidos en la técnica de UV-Vis, para lograr una separación entre destilados de agave y tequilas auténticos mediante esta técnica.

Antes de iniciar el análisis discriminante es necesario visualizar un modelo de análisis de componentes principales, el cual ayuda a tener una idea previa del comportamiento de las muestras, por lo cual se decidió analizar las muestras de tequilas auténticos por clase.

7.7.1 Análisis de Componentes Principales (datos brutos) con UV-Vis

Se realizó un PCA con el propósito de encontrar un modelo óptimo que nos permita diferenciar, en primera instancia, entre los tequilas auténticos y los destilados de agave, para posteriormente llevar a cabo técnicas quimiométricas supervisadas.

Dado que en los espectros del tequila la intensidad de la banda en torno a 280 nm depende de la clase, se decidió construir modelos de cada clase de tequila contra destilados de agave, para evitar que la varianza en el PCA se enfocara en separar las muestras por clase y no diferenciar los destilados de los tequilas como es el objetivo del presente trabajo.

7.7.1.1 Destilados de agave vs. Tequilas blancos

En la **Figura 20** se muestran los espectros UV-Vis en el intervalo de 200 a 400 nm utilizado para el modelo óptimo. Se tomó ese intervalo debido a que se encuentra una banda ancha alrededor de 280 nm característica de los tequilas auténticos; en este caso, la mayoría de los tequilas blancos, la intensidad de esta banda es de mayor intensidad con respecto a los destilados; sin embargo, no es el caso de todos los tequilas blancos.

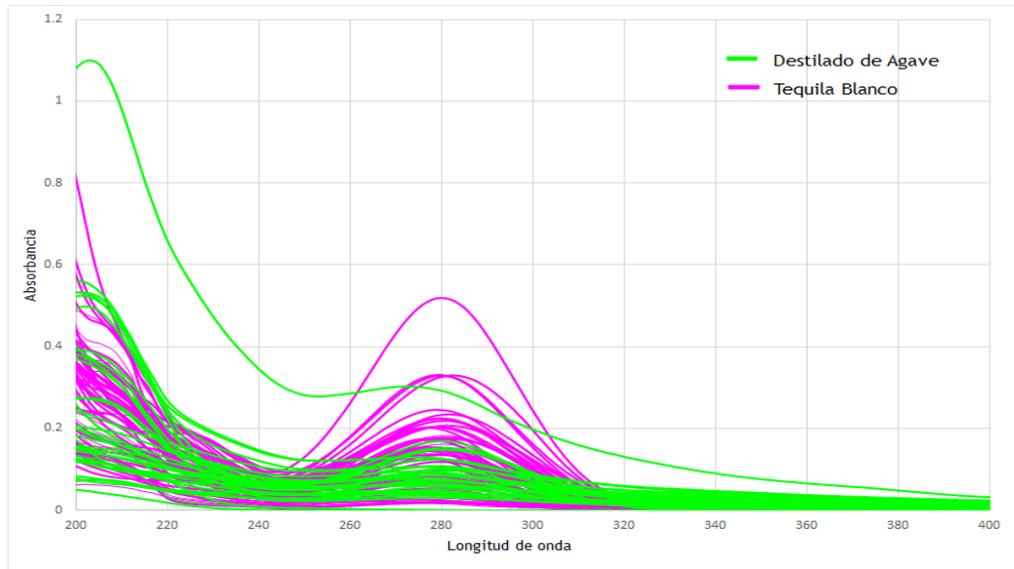


Figura 20. Espectros de absorción UV-Vis de 64 tequilas blancos auténticos y 35 destilados de agave de 200 a 400 nm.

Muestras atípicas

Durante el análisis fueron descartadas 5 muestras, 3 destilados de agave: DA 28, DA 29 y LA 14, y 2 tequilas blancos: TB 50 y TB 6-A, por estar mal agrupados.

Para justificarlo se activaron las muestras atípicas en el PCA óptimo. En la **Figura 21**, se ubican un poco separadas del resto de tequilas blancos, como se observa en la **Figura 22** la absorbancia de esas muestras (línea punteada) es mayor en comparación con las demás.

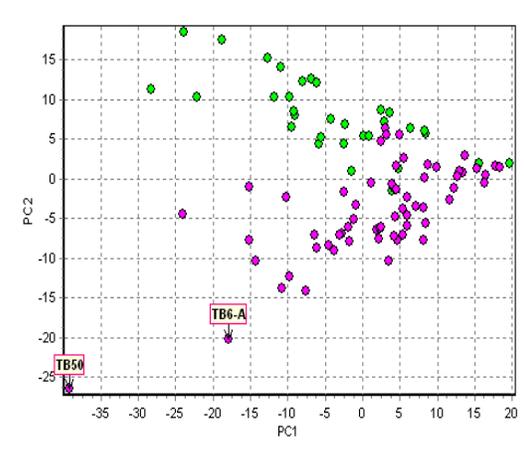


Figura 21. Diagrama de scores de PCA óptimo de tequilas blancos y destilados de agave, subespacio PC1-PC2 con TB 50 y TB 6-A activadas.

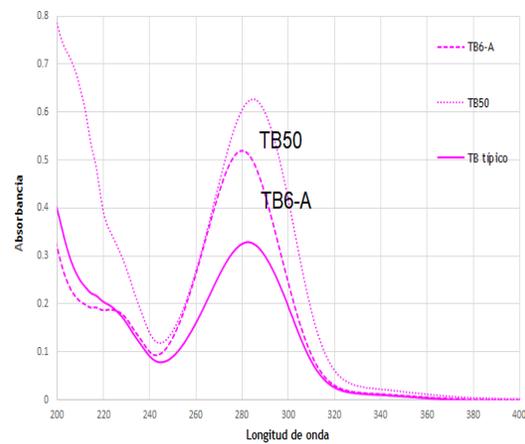


Figura 22. Espectros de absorción UV-Vis de tequilas blancos descartados del PCA óptimo y un TB típico de 200 a 400 nm.

En el caso de los destilados de agave, al activar dichas muestras en el diagrama de scores como se muestra en la **Figura 23**, se localiza el DA 28 y LA 14, separadas del conjunto de destilados, gastando la varianza en separar dichas muestras del resto (tequilas blancos y destilados); el destilado DA 29 se ubica en el grupo de los tequilas, y es que en efecto, al observar su espectro en la **Figura 24**, éste es muy similar a un tequila blanco mixto; en cuanto los espectros de las muestras DA 28 y LA 14, se presentan con una intensidad superior a la de incluso de un tequila blanco y no a la de un destilado típico.

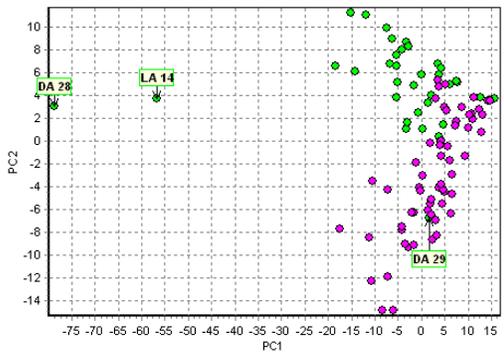


Figura 23. Diagrama de scores, subespacio PC1-PC2 óptimo de tequilas blancos y destilados de agave, con DA 28, DA 29 y LA 14 activadas.

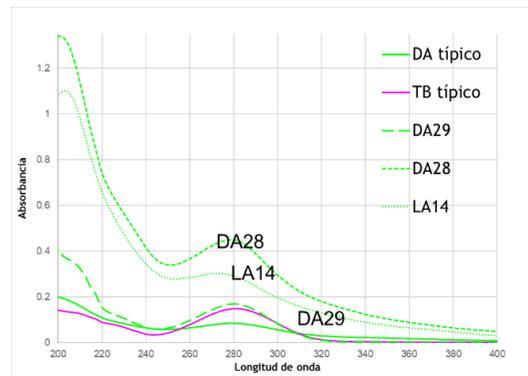


Figura 24. Espectros de absorción UV-Vis de destilados de agave descartados (DA 29, DA 28 y LA 14) del PCA óptimo, un TB y DA óptimos de 200 a 400 nm.

Indagando sobre la información en las etiquetas de las muestras DA 28 y DA 29, se encontró que dichos destilados son producidos por la misma destilería, llamada “Destilería María de la Paz S.A de C.V” ubicada en Silao, Guanajuato, México. En la etiqueta de ambos destilados dice que son elaborados con agave tequilana Weber var. Azul, no llamados “tequilas” posiblemente porque Silao no es un municipio con denominación de origen y que por tanto no cumple con la NOM-006-SCFI-2005 [2].

El DA 28 llamado “Oro de Guanajuato” menciona que tiene un añejamiento de 8 meses mostrado en la **Figura 25 (a)**, y el DA 29 llamado “Plata de Guanajuato” se le denomina blanco mostrado en la **Figura 25 (b)** sin proceso de añejamiento.



Figura 25. Destilados de agave de marca comercial “Oro de Guanajuato”.
 (a) Destilado añejo 8 meses, corresponde a muestra DA 28. (b) Destilado blanco, corresponde a muestra DA 29.

Modelo óptimo

El modelo satisfactorio se obtuvo con los datos brutos auto-escalados, en un intervalo de 200 a 400 nm; las muestras están caracterizadas por 200 variables del espectro. En la **Figura 26 (a)** se muestran los scores en el subespacio PC1-PC2, en donde se constata una cierta separación entre los tequilas blancos (100 % agave y mixtos) y destilados de agave, sobre todo en dirección PC2. Los tres primeros PC's explican un 97.91 % de la varianza inicial (PC1: 60.50 %, PC2: 30.41 %, PC3: 7 %).

La **Figura 26 (b)** se visualiza la separación en el subespacio PC1-PC2-PC3.

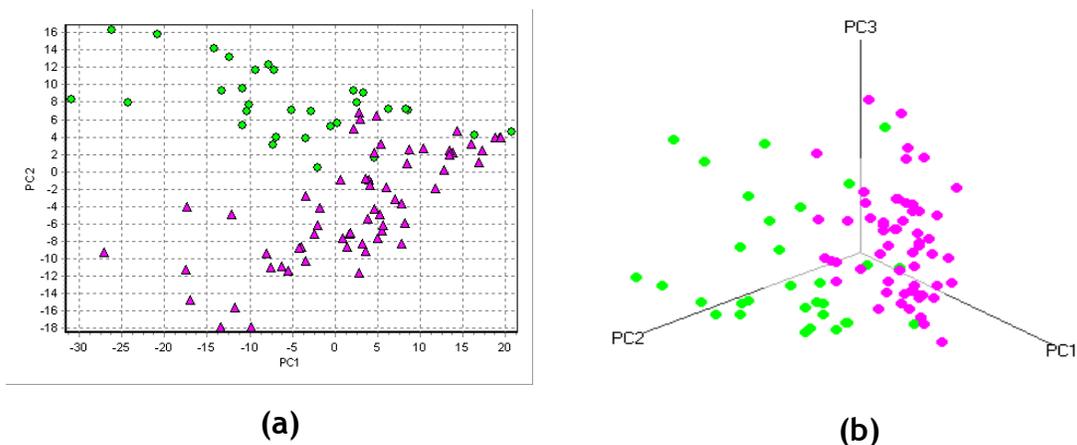


Figura 26. Diagrama de scores de PCA de tequilas blancos (100 % agave y mixtos) y destilados de agave con datos brutos, auto-escalados, intervalo 200 a 400 nm, (a) subespacio PC1-PC2.
 (b) subespacio PC1-PC2-PC3.

En la **Figura 27** se observa que en la frontera algunos tequilas mixtos (en círculo) se entre mezclan con los destilados. En la **Figura 28** se puede constatar que los

perfiles de los espectros en la región de 240 a 400 nm de los tequilas blancos mixtos y los destilados de agave existe una gran similitud, en comparación con los 100 % agave, lo que posiblemente indique una composición química semejante.

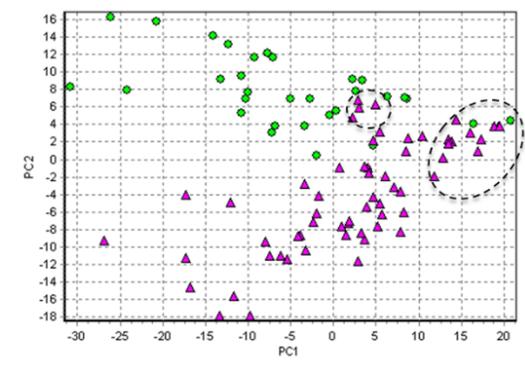


Figura 27. Diagrama de scores de PCA óptimo de tequilas blancos (100 % agave y mixtos) y destilados de agave, resaltando TMB traslapados, subespacio PC1-PC2.

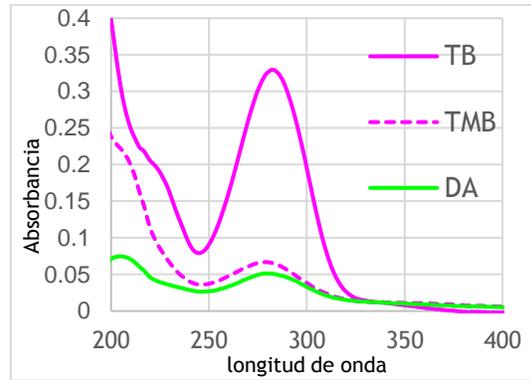
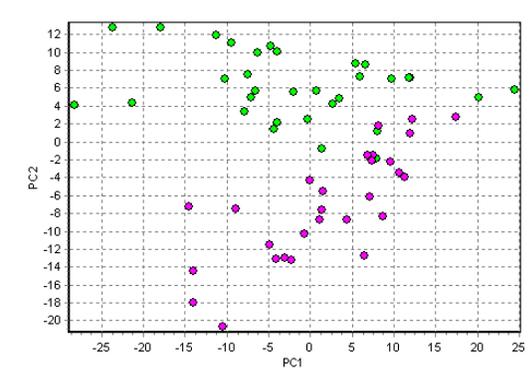


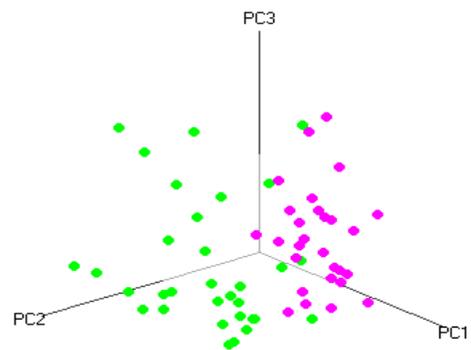
Figura 28. Espectros típicos de absorción UV-Vis de Tequilas blancos auténticos (100% agave y mixto) y destilado de agave de 200 a 400 nm.

Tomando en cuenta que existe una mayor diferencia entre los espectros de tequilas blancos 100 % agave y los destilados de agave, se realizó un PCA sin los tequilas mixtos.

En la **Figura 29 (a)** se muestra el diagrama de scores en el subespacio PC1-PC2, en donde se observa una separación más clara entre estos dos grupos. Los tres primeros PC's explican un 97.54 % de la varianza inicial (PC1: 55.75 %, PC2: 34.3 %, PC3: 7.49 %). PC2 es el mayor responsable de la diferenciación. La **Figura 29 (b)** visualiza la separación en el subespacio PC1-PC2-PC3.



(a)



(b)

Figura 29. Diagrama de scores de PCA de tequilas blancos 100 % agave y destilados de agave con datos brutos, auto-escalados, intervalo 200 a 400 nm. **(a)** Subespacio PC1-PC2, **(b)** subespacio PC1-PC2-PC3.

Exploración de pautas internas

Se estudiaron pautas internas en los scores. Se identificó una en el sentido que indican las flechas en la **Figura 30**, tanto para los tequilas blancos (100 % agave y mixtos) como para los destilados de agave, según la cual, al desplazarnos de scores positivos a negativos de PC1 aumenta la absorbancia de la banda característica de 280 nm; esto se corroboró graficando los espectros UV-Vis en la **Figura 31** de muestras tomadas del modelo óptimo. De acuerdo con Barbosa y col. [61], dicha intensidad de esta banda está relacionada con el contenido de derivados furánicos.

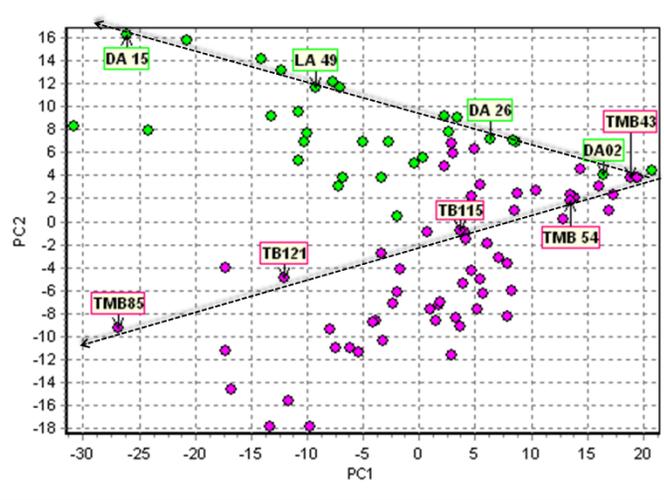
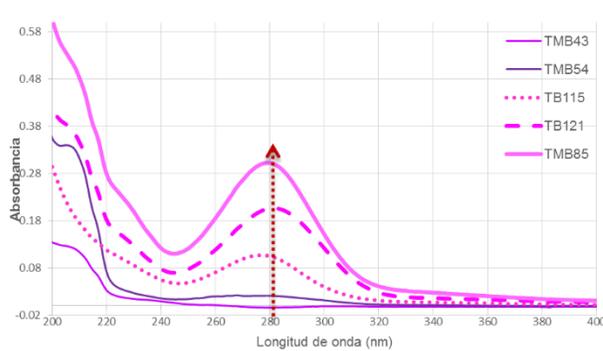
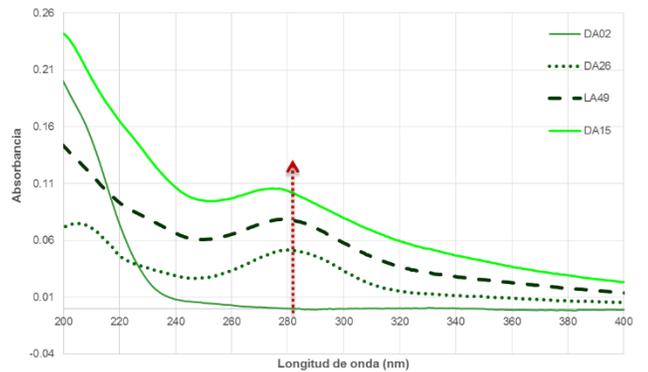


Figura 30. Diagrama de scores de PCA óptimo de tequilas blancos (100 % agave y mixtos) y destilados de agave, indicando pautas internas, subespacio PC1-PC2.



(a)



(b)

Figura 31. Espectro UV-Vis de 200 a 400 nm de muestras seleccionadas en dirección de PC1 del modelo óptimo PCA. (a) Tequilas blancos, (b) Destilados de agave

Al comparar estos resultados con la determinación de dichos compuestos, realizada en esta tesis por HPLC, efectivamente se constató que existe una correlación entre la intensidad de esta banda y el contenido furánico. En la **Tabla 10** se presentan estos contenidos determinados por HPLC, muestras ubicadas a lo largo de cada trayectoria (**Figura 30**).

Tabla 10. Concentración de furanos para muestras en pauta interna en modelo óptimo para tequilas blancos y destilados de agave.

Muestra	5-MF (mg/L)	FUR (mg/L)	2-AF (mg/L)	5-MF (mg/L)	Promedio (mg/L)
Destilados de agave					
DA 15	*ND	1.29	0.24	0.72	0.56
DA 02	*ND	*ND	*ND	*ND	*ND
Tequilas auténticas					
TMB 85	*ND	13.53	1.71	12.42	6.91
TB 115	*ND	6.07	0.92	2.73	2.43
TMB 43	*ND	0.46	0.36	*ND	0.205

*ND= no detectable

En el diagrama de scores las muestras de destilados de agave se encuentran en la parte superior del PCA y el conjunto de tequilas blancos distribuido en la parte inferior del mismo (**Figura 32**), en la frontera de distribución de ambos conjuntos las muestras traslapadas, LA 17 y TMB 15, tienen espectros similares como se observa en la **Figura 33**. lo que indica que la absorbancia a 280 nm aumenta en dirección de la flecha. Tal pauta interna se comprueba con los datos obtenidos de la cuantificación por HPLC y se denotan en la **Tabla 11**.

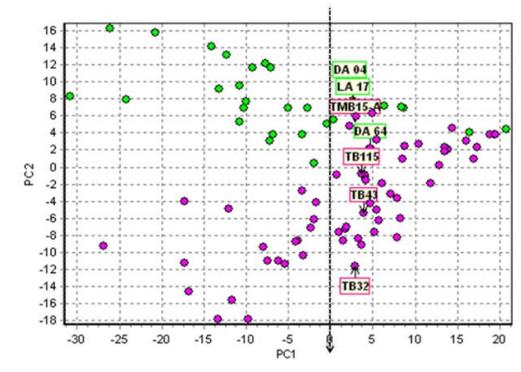


Figura 32. Diagrama de scores de PCA óptimo de tequilas blancos (100 % agave y mixtos) y destilados de agave, indicando pauta interna en dirección de PC2, subespacio PC1-PC2.

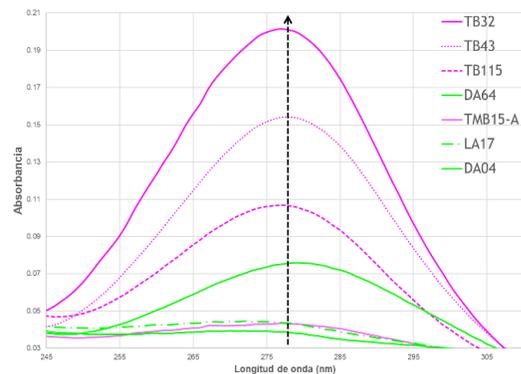


Figura 33. Espectros UV-Vis de 200 a 400 nm de tequilas blancos y destilados de agave tomados en dirección PC2 del modelo óptimo de PCA.

Tabla 11. Concentración de furanos para muestras en pauta interna en dirección PC2 en modelo óptimo para tequilas blancos y destilados de agave.

Muestra	5-HMF (mg/L)	FUR (mg/L)	2-AF (mg/L)	5-MF (mg/L)	Promedio (mg/L)
DA 04	*ND	0.25	0.19	*ND	0.11
LA 17	*ND	0.38	0.31	*ND	0.17
DA 64	*ND	2.86	0.66	2.75	1.57
TB 115	*ND	6.07	0.92	2.73	9.72
TB 43	*ND	8.55	3.29	5.02	4.215
TB 32	*ND	64.23	1.76	7.17	18.29

*ND= no detectable, **LC= límite de cuantificación

Análisis de *loadings*

En la **Figura 34** se muestran los *loadings* considerados importantes en la separación; el *loading 1* asigna mayor importancia a los compuestos en torno a las variables en 243 nm, mientras que el *loading 2* se define en los compuestos asociados a 280 nm, los cuales son la absorción atribuida a la mezcla de furfurales.

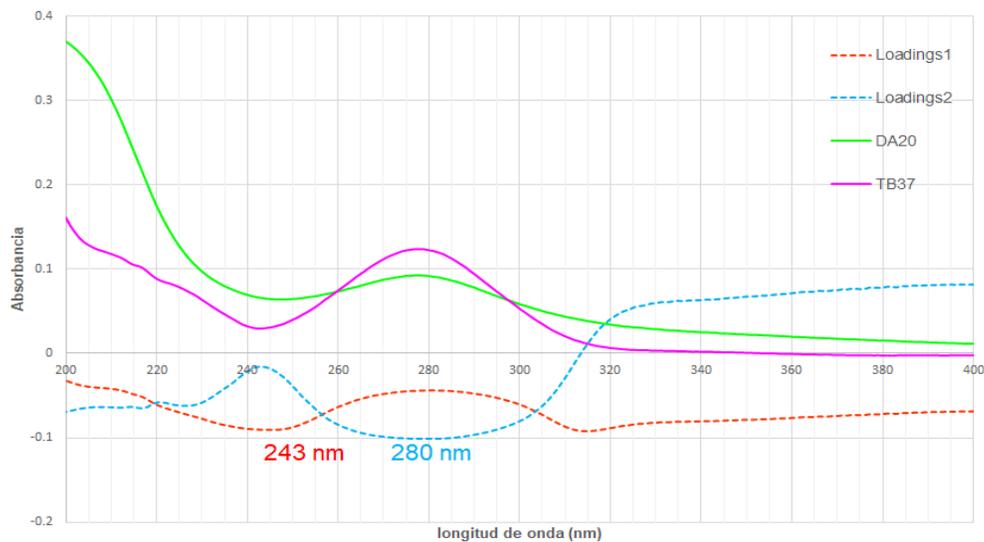


Figura 34. Gráfico de loadings a partir del PCA óptimo tequilas blancos y destilados de agave.

7.7.1.2 Destilados de agave vs. Tequilas reposados.

La **Figura 35** ilustra una muestra representativa de un tequila reposado y otra para un destilado de agave en un intervalo de 200 a 440 nm. Ambos espectros presentan un máximo de absorción alrededor de los 280 nm, donde el tequila reposado es el de mayor intensidad en todo el intervalo. También, se puede notar un ligero aumento de absorbancia después de los 300 nm esto debido a la detección de algunos compuestos como aldehídos en la región UV entre 365 nm y 390 nm [12].

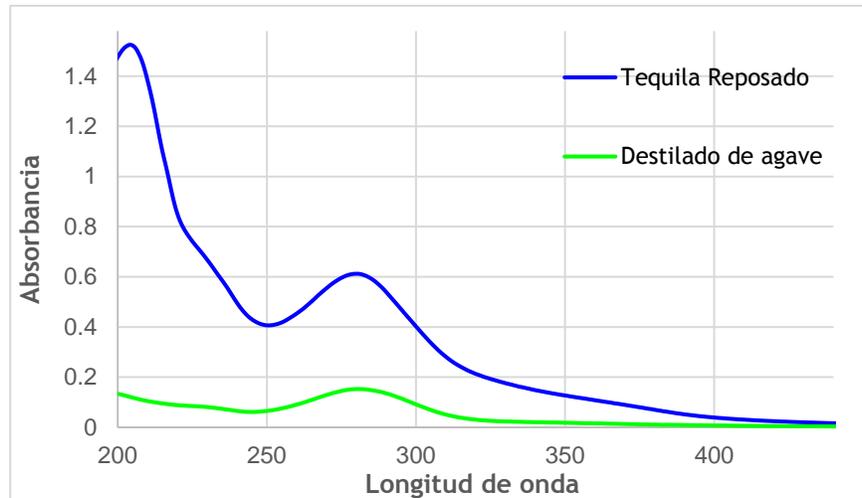


Figura 35. Espectros típicos de absorción UV-Vis para tequila reposado y destilado de agave de 200 a 440 nm.

Muestras atípicas

Al realizar el análisis se descartaron 3 destilados de agave DA 28, DA 29 y LA 14 mostrados en la **Figura 23**, explicadas en el apartado **7.7.1.1 Tequilas Blancos vs. Destilados de agave**. Asimismo, se descartaron 6 muestras de tequilas reposados TR 19, TR 29, TR 99, TR 116, TMR 42 y TMR 76.

De una manera más detallada cada muestra atípica se activó en el PCA óptimo y se graficaron para comparar sus espectros UV-Vis con muestras tomadas del PCA óptimo.

En la **Figura 36** se observa que las muestras TR 29, TR 99 y TMR 42 están muy alejadas del conjunto de tequilas reposados, usando posiblemente la varianza en diferenciar los conjuntos de dichas muestras, desviando nuestro objetivo. Se puede notar en la **Figura 37** los espectros de estas, tal que presentan una banda de absorbancia mayor en comparación con el conjunto de tequilas reposados, podría ser consecuencia del abocamiento excesivo, a excepción de la muestra TMR 42 donde su absorbancia aumenta a longitudes mayores de 350 nm.

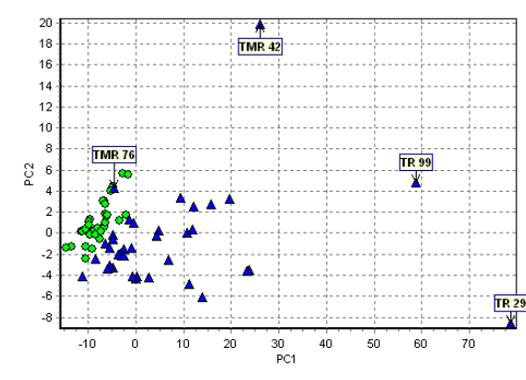


Figura 36. Diagrama de scores de PCA óptimo de tequilas reposados y destilados de agave, subespacio PC1-PC2 con TR29, TR99, TMR42 Y TMR76 activadas.

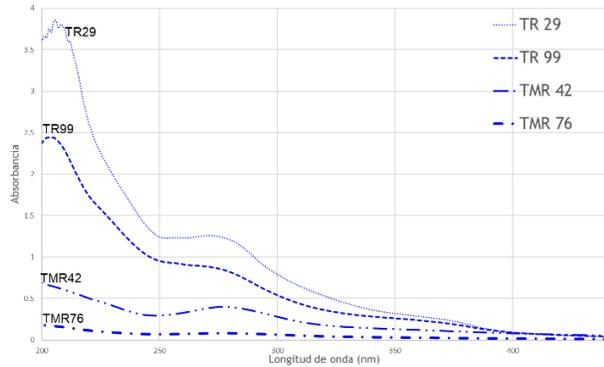


Figura 37. Espectros de absorción UV-Vis de tequilas reposados descartados del PCA óptimo de 200 a 440 nm.

Para el caso de TMR 76 como se ilustra en la **Figura 37**, esta muestra aparece en la región de los destilados de agave, comparando su espectro con un típico en su clase, en la **Figura 38** la absorbancia es inferior en todo el intervalo de longitud de onda y su comportamiento es bastante similar al de un destilado de agave.

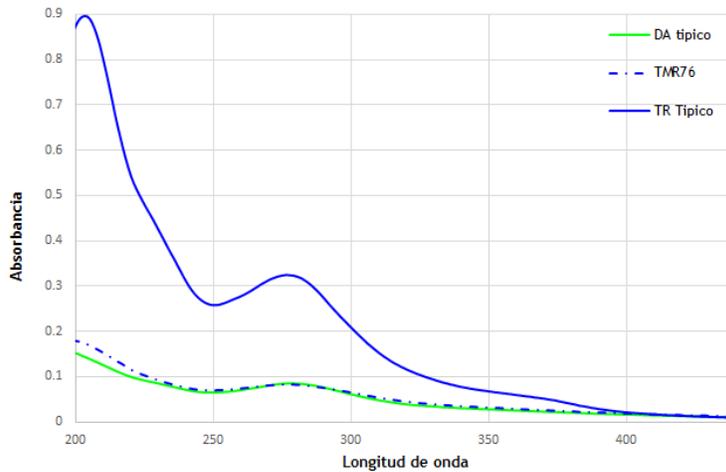


Figura 38. Espectros de absorción UV-Vis de tequila reposado descartado del PCA óptimo, un TR y DA típicos, de 200 a 500 nm.

Las muestras TR 19, TR 78 y TR 116 no se encuentran mal agrupados en el subespacio PC1-PC2 como se nota en la **Figura 39 a)**, sin embargo, en la **Figura 39 b)** que representa el PC1-PC2-PC3, las muestras se localizan separados del grupo de TR; analizando sus espectros podemos ver en la **Figura 40** que no cuentan con el perfil característico de un tequila reposado, ni de algún otro tequila auténtico, ya que presenta un máximo de absorción entre 300 y 400 nm, y carece de absorbancia con máximo a 280 nm, en lugar de disminuir en absorbancia como los espectros típicos de tequilas, estos aumentan.

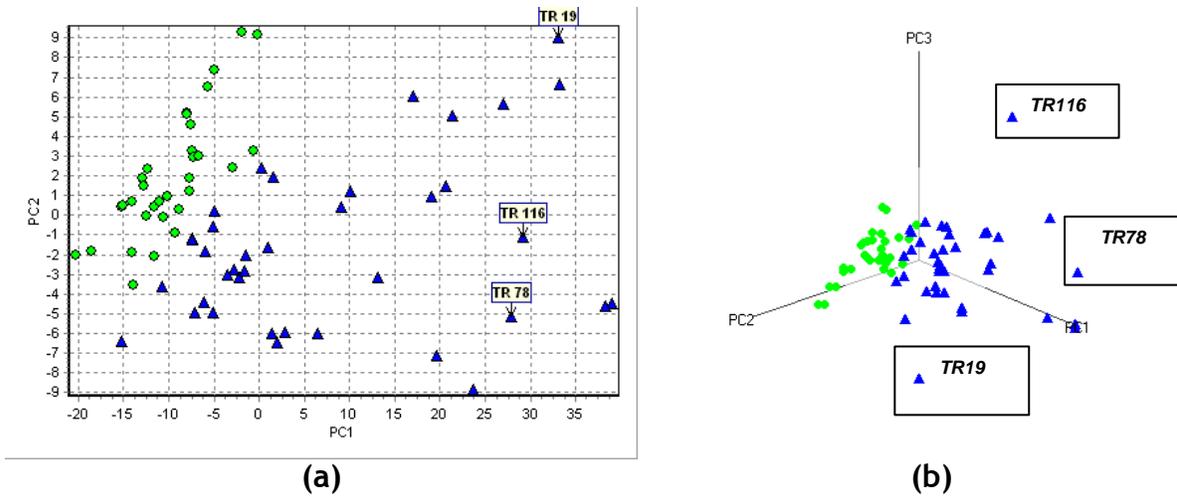


Figura 39. Diagrama de scores de PCA óptimo de tequilas reposados y destilados de agave, subespacio PC1-PC2 con TR19, TR78 y TR116 activados. (a) Subespacio PC1-PC2, (b) subespacio PC1-PC2-PC3.

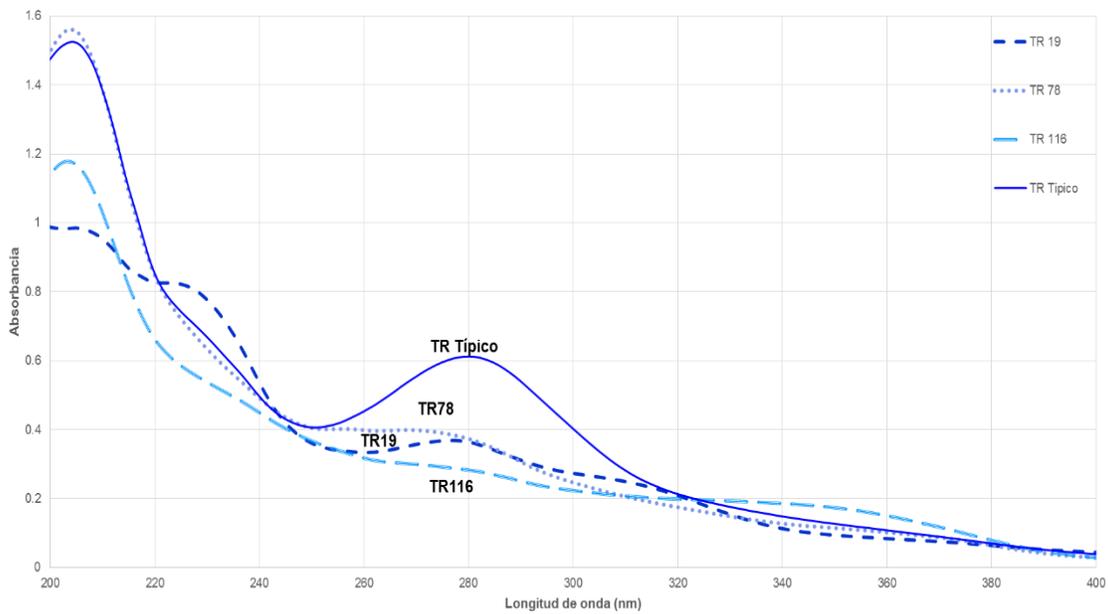


Figura 40. Espectros de absorción UV-Vis de tequilas reposados descartados del PCA óptimo y un TR típico, de 200 a 400 nm.

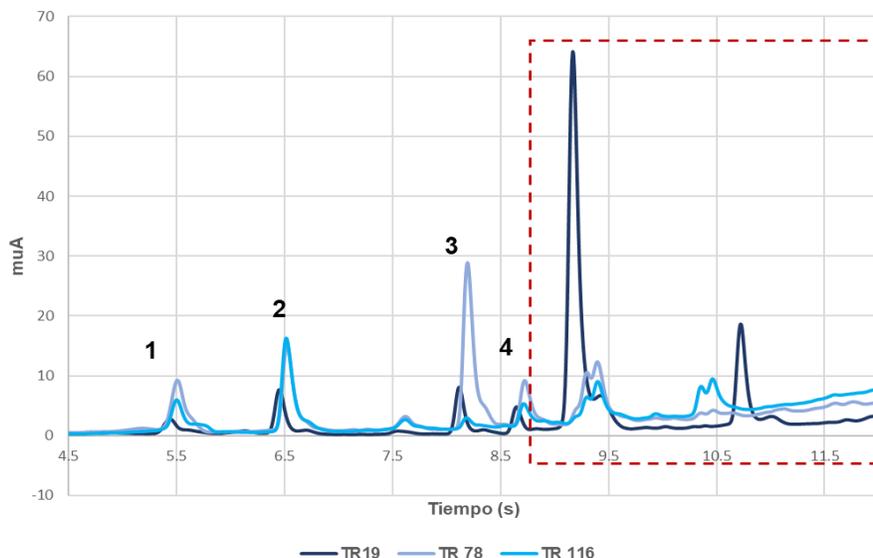


Figura 41. Cromatogramas HPLC Muestras de tequilas reposados a) TR 19, b) TR 78, b) TR 116. (1) 5-HMF (2) FUR (3) 2-AF (4) 5-MF.

Condiciones: columna Eclipse XDB- C18 15 cm (5 μ m, 4.6 x 250 mm), T=40 $^{\circ}$ C, flujo 1 mL/min, vol. Iny. 20 μ L, gradiente lineal: 0 min 10 % A, 10 min 70 % A. λ = 280 nm.

En la **Figura 41**, al analizar los cromatogramas de dichas muestras se observa la presencia de dos picos adicionales y desconocidos en comparación con el cromatograma de un TR típico, lo cual coincide con el perfil del espectro UV-Vis que es químicamente diferente. Estos picos no han sido todavía identificados, pero se sospecha que se trata de metil 2-furoato, molécula con polaridad mayor al 2-metilfurano y que se produce en abundancia debido a la concentración original de carbohidratos y se ve reflejada las características sensoriales de la bebida [12].

Modelo óptimo

El modelo óptimo se obtuvo con los datos brutos en auto-escalados en un intervalo de 200 a 440 nm. En la **Figura 42 (a)** se muestran los scores en el subespacio PC1-PC2, donde se observa una separación entre los tequilas reposados y destilados de agave, principalmente sobre PC1. Los tres primeros PC's explican un 98.82 % de la varianza inicial (PC1: 90.45 %, PC2: 7.32 %, PC3: 2.06 %). La **Figura 42 (b)** se visualiza la separación en el subespacio PC1-PC2-PC3.

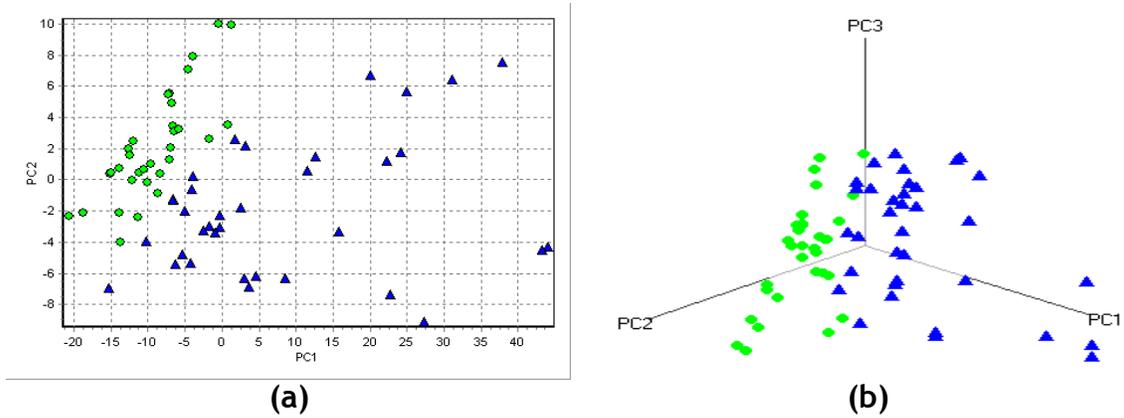


Figura 42. Diagrama de scores de PCA de tequilas reposados (100 % agave y mixtos) y destilados de agave con datos brutos, auto-escalados, intervalo 200 a 440 nm, (a) subespacio PC1-PC2. (b) Subespacio PC1-PC2-PC3.

Exploración de pautas internas

Se examinaron muestras señaladas en la **Figura 43** tomadas del PCA óptimo, encontrando una pauta interna en el sentido las flechas, donde, en el intervalo de 315 a 440 nm la absorbancia disminuye en PC2 de positivo a negativo, tanto para tequilas reposados como destilados de agave, el análisis se corroboró graficando los espectros UV-Vis mostrados en la **Figura 44**.

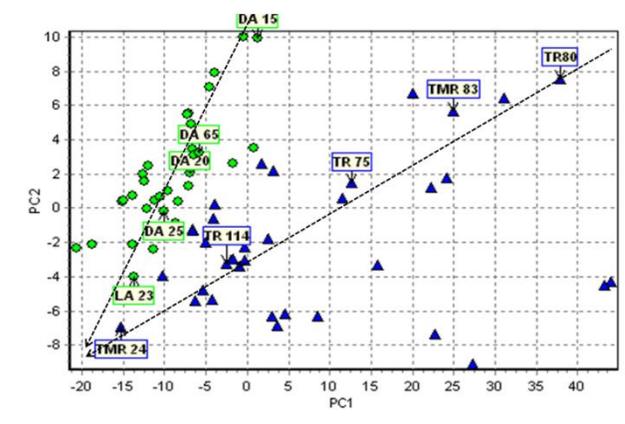


Figura 43. Diagrama de scores de PCA óptimo de tequilas reposados y destilados de agave, indicando pautas internas, subespacio PC1-PC2.

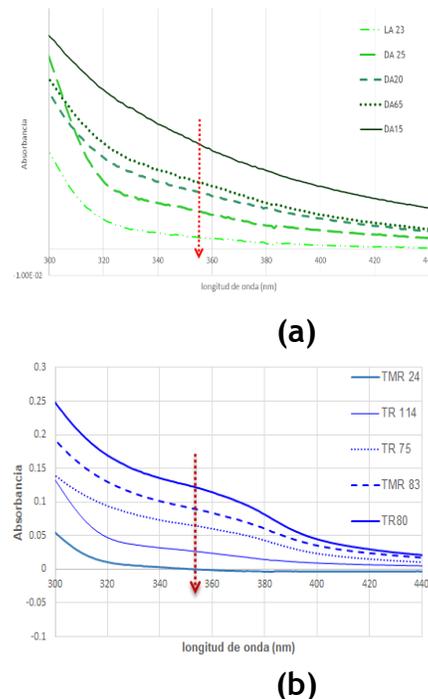


Figura 44. Espectro UV-Vis de 200 a 440 nm de muestras seleccionadas en dirección de PC2 del modelo óptimo PCA. (a) Destilados de agave, (b) Tequilas reposados

A lo largo de PC1, como indica el sentido de la flecha en la **Figura 45** se encuentra la pauta interna que explican los espectros UV-Vis en la **Figura 46** al desplazarnos de valores negativos a positivos de PC1 la absorbancia a 280 nm aumenta tanto para destilados de agave como tequilas reposados, esto considerado como resultado a la concentración de compuestos furanos, lo que puede comprobarse con la **Tabla 12**.

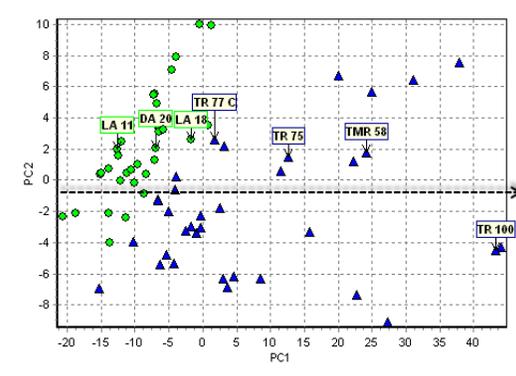


Figura 45. Diagrama de scores de PCA óptimo de tequilas reposados y destilados de agave, indicando pauta interna en dirección de PC1, subespacio PC1-PC2.

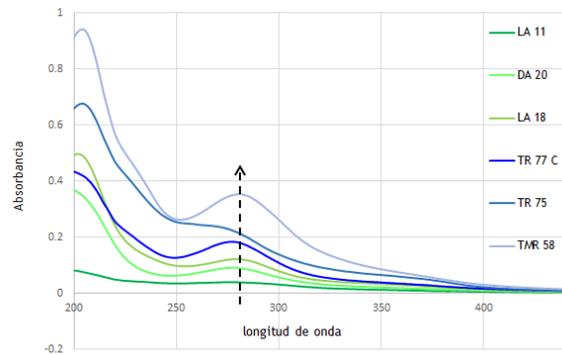


Figura 46. Espectro UV-Vis de 200 a 440 nm de muestras seleccionadas en dirección de PC1 del modelo óptimo PCA para TR.

Tabla 12. Concentración de furanos para muestras en pauta interna en PC1 en modelo óptimo para tequilas reposados y destilados de agave.

Muestra	5-HMF (mg/L)	FUR (mg/L)	2-AF (mg/L)	5-MF (mg/L)	Promedio (mg/L)
TMR 58	**<LC	3.29	1.46	5.78	2.63
TR 77C	1.81	1.40	2.49	1.21	1.73
LA 18	1.44	1.05	0.31	0.75	0.89
LA 11	**<LC	0.48	0.22	0.46	0.29

*ND= no detectable, **LC= límite de cuantificación

Análisis de loadings

El loading más significativo fue el correspondiente a PC1 quien contribuyó en mayor grado a la separación de los tequilas reposados y destilados de agave. El gráfico muestra que todas las variables tuvieron esencialmente el mismo peso en todo el intervalo de 250 a 450 nm. El loading 2 está relacionado a la variable 284 nm donde absorben los compuestos furánicos.

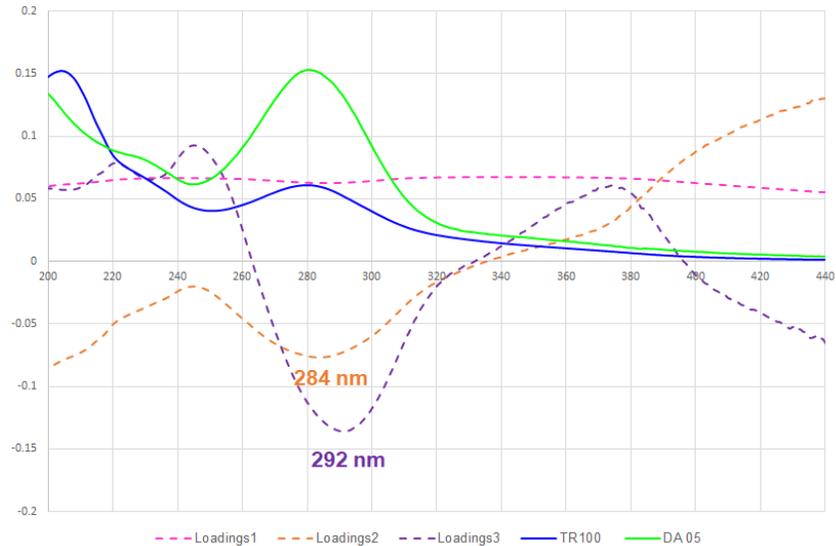


Figura 47. Gráfico de loadings a partir del PCA óptimo tequilas reposados y destilados de agave.

7.7.1.3 Destilados de agave vs. Tequilas añejos y extra - añejos.

Los espectros típicos de tequilas añejo o extra-añejo, tienen un perfil de mayor intensidad en absorbancia, en el intervalo 250 a 450 nm en comparación con las demás clases de tequilas, como lo revela la Figura 48. Estas clases son las más añejadas y abocadas por lo que contienen un mayor número de componentes en comparación con los blancos y reposados [30].

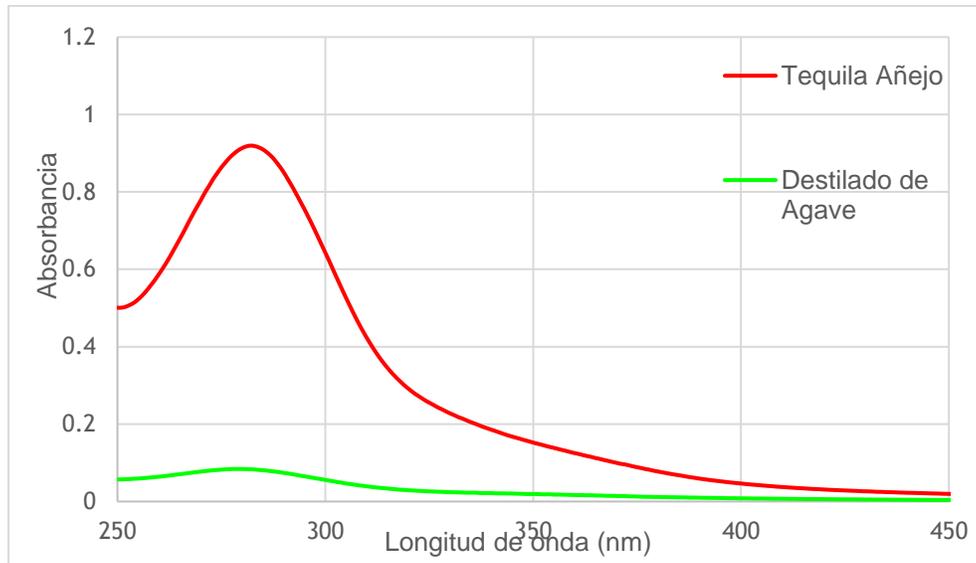


Figura 48. Espectros típicos de absorción UV-Vis para tequila añejo/extra-añejo y destilado de agave de 250 a 450 nm.

Muestras atípicas

Ahora bien, para obtener el modelo óptimo fue necesario desactivar dos muestras de tequila añejo (TA 84 y TA 99) y tres de destilados de agave; estos últimos justificados en el apartado 7.7.1.1 Tequilas Blancos vs. Destilados de agave. La Figura 49 muestra el diagrama de scores PC1-PC2, con las muestras descartadas de tequila añejo y sus correspondientes espectros.

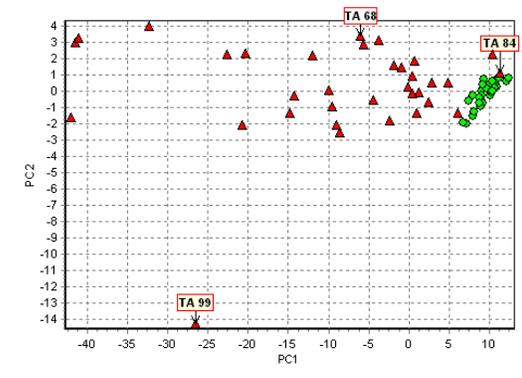


Figura 49. Diagrama de scores de PCA óptimo de tequilas añejos/extra - añejos y destilados de agave, subespacio PC1-PC2 con TA 84 y TA 99 activadas.

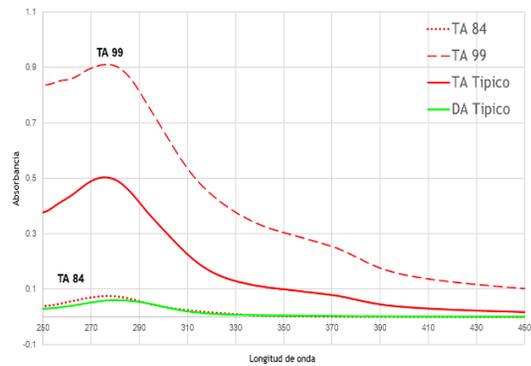


Figura 50. Espectros de absorción UV-Vis de tequilas añejos descartados del PCA óptimo, un TA y un DA típicos de 250 a 450 nm.

El TA 84 fue descartado por presentar un comportamiento similar al de un destilado como lo revelan sus espectros en la **Figura 50**. La muestra TA 99 es diferenciada por PC2 como se nota en la **Figura 49** y se caracteriza por poseer un espectro con una absorbancia notablemente superior en todo el intervalo de longitud de onda, como se observa en la **Figura 50**, esto ocurre no necesariamente por el alto contenido furánico, si no debido a un abocamiento excesivo. En la **Tabla 13** se encuentra el contenido furánico de una muestra bien comportada comparada con la muestra TA 99, donde la TA 68 presenta mayor contenido furánico que la TA 99.

Tabla 13. Concentración de furanos para tequilas añejos.

Muestra	5-HMF (mg/L)	FUR (mg/L)	2-AF (mg/L)	5-MF (mg/L)	Promedio (mg/L)
TA 99	0.17	11.52	1.84	14.65	7.05
TA típico (TA 68)	0.74	22.54	2.93	33.88	15.02

**LC= límite de cuantificación

Modelo óptimo

El modelo óptimo se obtuvo con auto-escalados, en un intervalo de 250 a 450 nm. En este caso el valor límite inferior para el análisis fue de 250 nm para evitar señales saturadas. La **Figura 51** muestra el gráfico de scores de PC1-PC2; tres PC's explican el 99.85 % de la varianza inicial (PC1: 98.47 %, PC2: 1.04 % y PC3:0.34 %). A lo largo de PC1 se observa la separación de ambos grupos; la dispersión de los scores de TA se debe a que composición química de éstos es más compleja y rica que los destilados de agave.

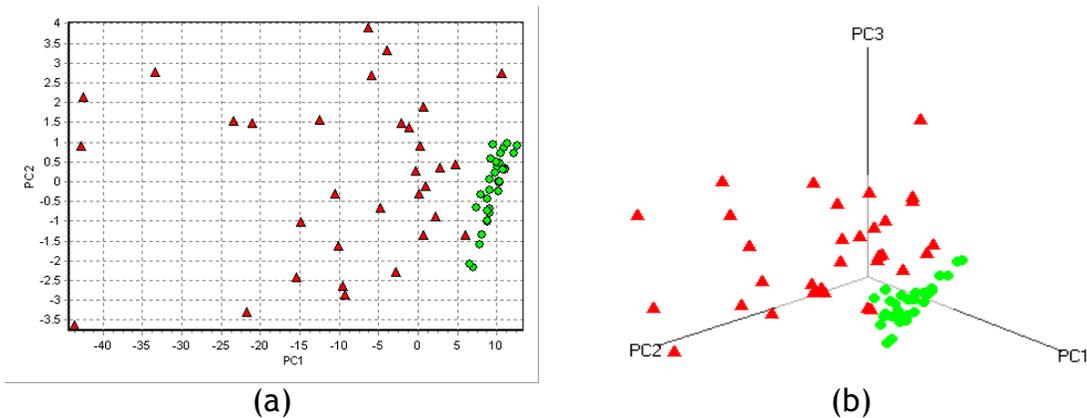


Figura 51. Diagrama de scores de PCA de tequilas añejos/extra-añejos y destilados de agave con datos auto-escalados, intervalo 250 a 450 nm. (a) Subespacio PC1-PC2. (b) en el subespacio PC1-PC2-PC3.

Exploración de pautas internas

En la **Figura 52** se muestra una pauta interna de valores positivos a negativos de PC1 como indica la flecha. En este sentido, los espectros presentan una mayor absorbancia en los tequilas añejos y extra-añejos (**Figura 53**), debido a que el contenido de componentes furánicos es mucho mayor que en los destilados de agave en los que su presencia es mínima. Esto se corrobora con los contenidos en la **Tabla 14**, donde la concentración es mayor en TEA 10 que en TA 15 y estos a su vez, mayor que los DA.

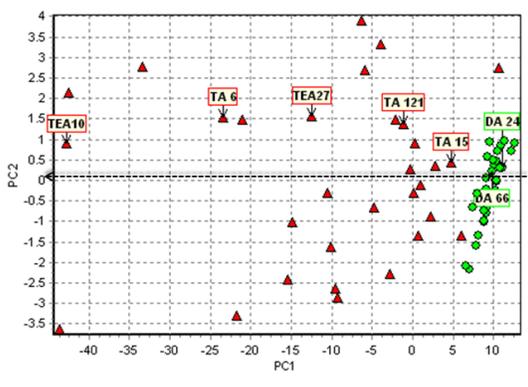


Figura 52. Diagrama de scores de PCA óptimo de tequilas añejos/extra-añejos y destilados de agave, indicando pauta interna en dirección de PC1, subespacio PC1-PC2.

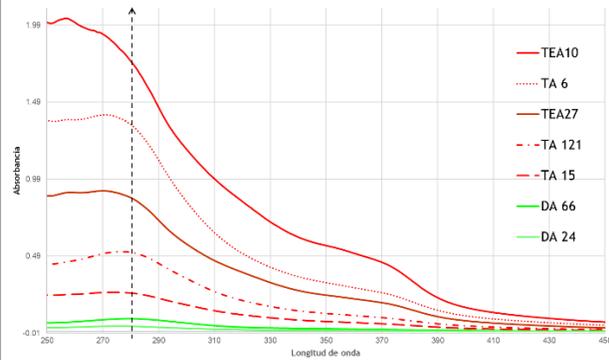


Figura 53. Espectros de absorción UV-Vis TR y DA tomados en dirección de PC1 del PCA óptimo, para pauta interna, en el intervalo de 250 a 450 nm.

Tabla 14. Concentración de furanos para muestras en pauta interna en dirección de PC1 de tequilas añejos y destilados agave.

Muestra	5-HMF (mg/L)	FUR (mg/L)	2-AF (mg/L)	5-MF (mg/L)	Promedio (mg/L)
TA 6	0.93	20.10	2.53	13.81	9.34
TEA 10	0.48	16.13	5.95	6.70	7.32
TEA 27	0.35	16.21	1.96	9.86	7.09
TA 15	0.39	1.78	1.81	2.88	1.71
DA 66	0.39	1.48	0.66	1.38	0.98
DA 24	**<LC	0.72	0.25	**<LC	0.24

*ND= no detectable, **LC= límite de cuantificación

Análisis de *Loadings*

Al revisar visualmente cada uno de los *loadings*, las regiones espectrales de mayor importancia son, para el segundo componente principal; 290 nm relacionado a compuestos furánicos, para el tercer componente principal; 292 y 370 nm de igual forma el primero a compuestos furánicos al igual que con el primer componente.

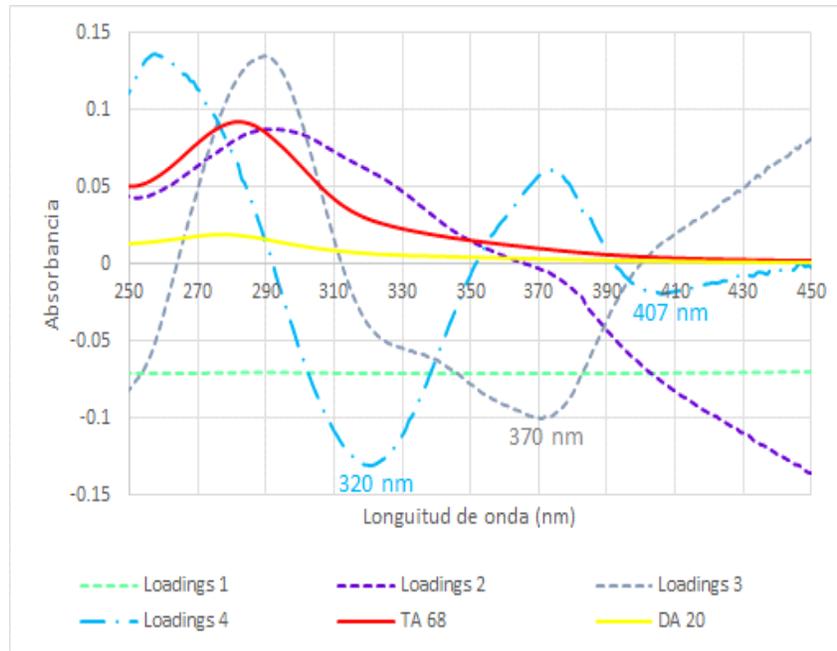


Figura 54. Gráfico de loadings a partir del PCA óptimo tequilas añejos y destilados de agave.

7.7.1.4 Análisis de Componentes Principales (1ra y 2da Derivada)

Se realizó el análisis de componentes principales con la primera y segunda derivadas; en ningún caso se logró una separación satisfactoria con los datos derivados.

7.7.2 Análisis Cluster (CA) con UV-Vis

7.7.2.1 Destilados de agave Vs Tequilas Blancos

Se realizó el análisis clúster a partir de los datos auto-escalados (intervalo: 200 a 400 nm). El dendograma de la **Figura 55** muestra dos grupos principales. El grupo 1 contiene la mayoría de los destilados de agave. A su vez, en el subgrupo 1a predominan los destilados y en el 1b los tequilas mixtos. El grupo 2 agrupa a la mayoría de los tequilas blancos y sólo existen dos destilados en este grupo. En ambos casos se constata que la ubicación de los destilados de agave y tequilas mixtos se traslapan debido a sus similitudes químicas y espectrales.

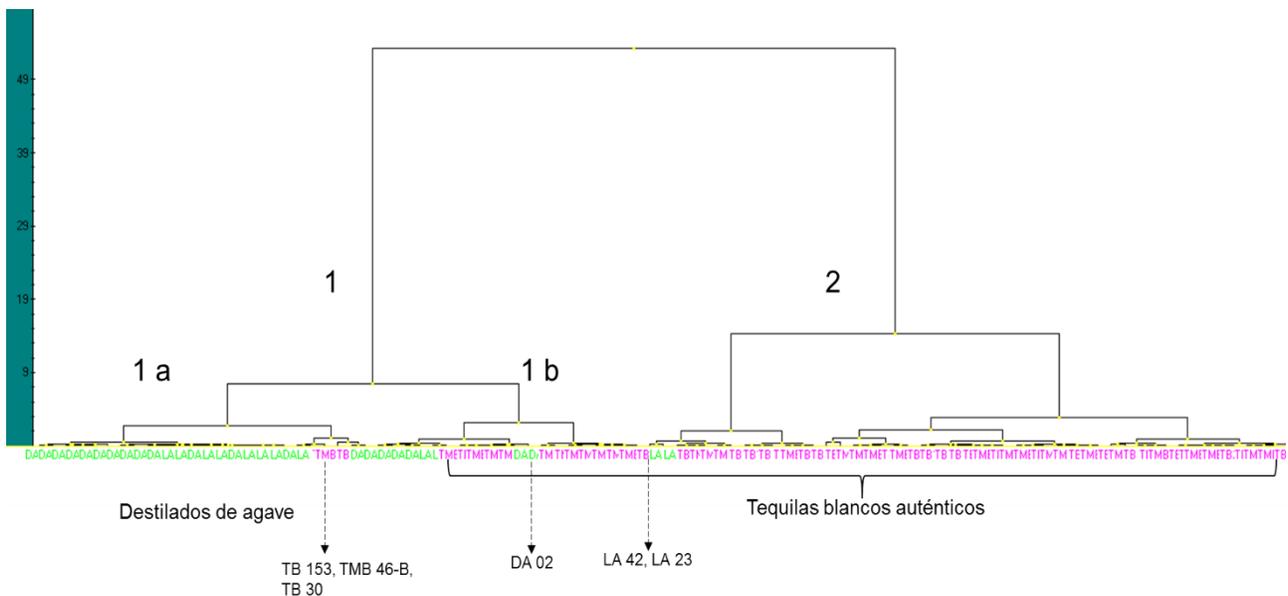


Figura 55. Dendrograma de Tequilas blancos y destilados de agave con datos brutos UV-Vis, algoritmo Ward y Distancia correlación de Pearson.

7.7.2.2 Destilados de agave Vs Tequilas Reposados

El análisis clúster se realizó con los datos brutos auto-escalados, en un intervalo de 200 a 440 nm (las mismas condiciones utilizadas para el PCA). El mejor resultado se consiguió con el algoritmo Ward y la distancia euclídea al cuadrado.

En la **Figura 56**, podemos observar la formación de dos grupos; el grupo uno contiene solamente tequilas reposados, el grupo dos está dividido en el subgrupo 2a el cual contiene a la mayoría de los tequilas reposados, y a su vez cuenta con otro subgrupo que contiene destilados de agave; en el subgrupo 2b se ubican los destilados de agave, con dos tequilas reposados mixtos (TMR104 y TMR24).

7.7.2.3 Destilados de agave Vs Tequilas Añejos y Extra-añejos

Con los datos en bruto, se estudió el análisis de conglomerados. Como modelo óptimo se obtuvo un dendograma mostrado en la **Figura 58** con algoritmo Ward y distancia Euclídea cuadrada. Los conglomerados, de forma general, son dos: el grupo uno corresponde a los destilados de agave y el grupo dos a los tequilas añejos.

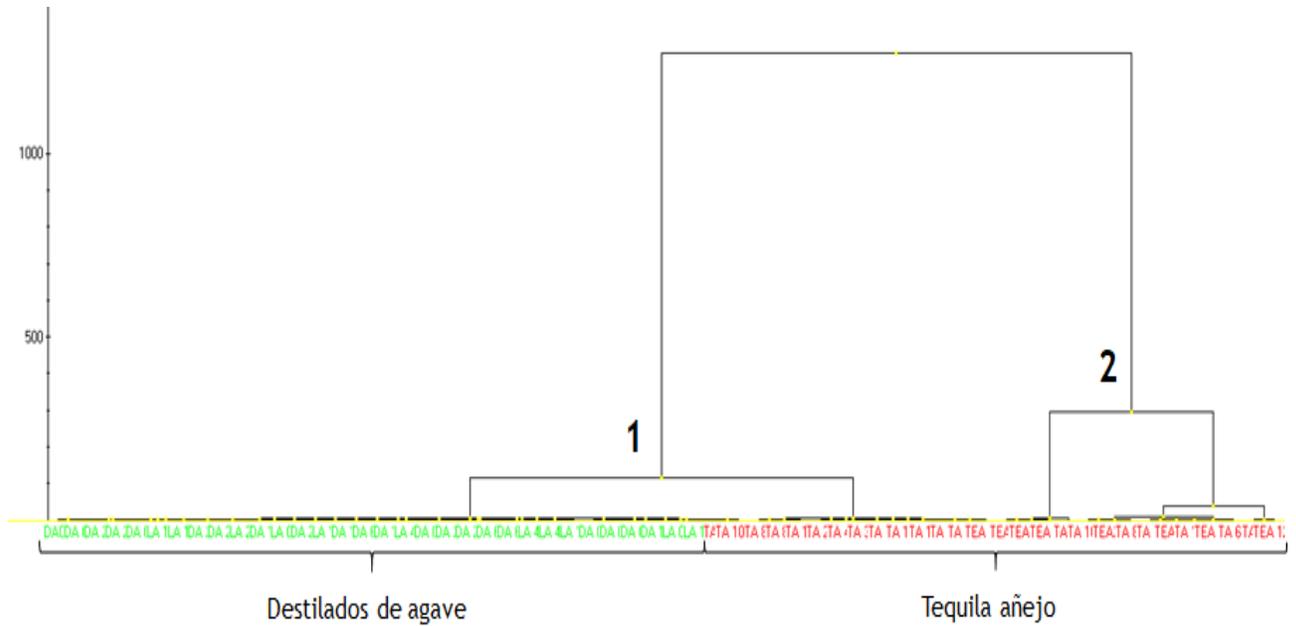


Figura 58. Dendograma de tequilas añejos y destilados de agave con datos brutos UV-Vis, algoritmo Ward y Distancia Euclídea cuadrada.

7.7.3 Técnicas supervisadas

Una vez estudiados los modelos óptimos de las técnicas exploratorias, se prosiguió con las técnicas supervisadas, ya que se tienen los intervalos ideales para la separación y es posible escoger muestras de validación.

7.7.3.1 Support Vector Machines (SVM) con datos UV-Vis

7.7.3.1.1 Destilados de agave vs Tequilas Blancos

El modelo se realizó a partir de los datos auto-escalados (intervalo: 200 a 400 nm). Se utilizó un kernel tipo gaussiano con una penalización admitida de $C=100$ y sigma de seis. En la **Figura 59** se observa la frontera entre las dos categorías, junto con las muestras de validación (triángulos amarillos) y las cuales están especificadas en la **Tabla 15**, todas fueron predichas correctamente.

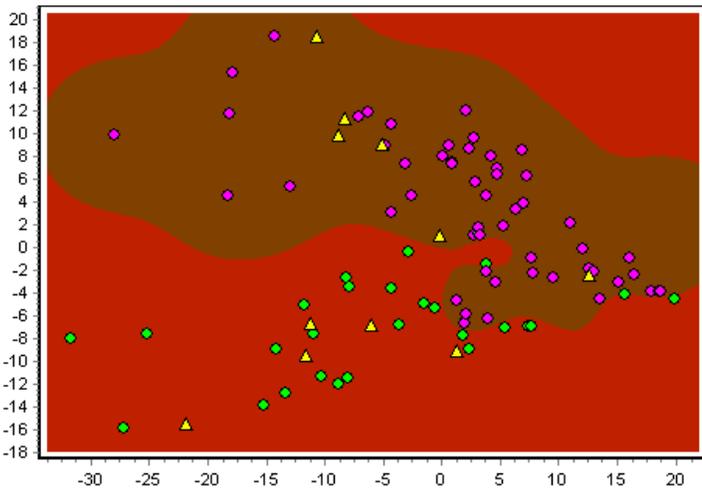


Tabla 15. Muestras de validación de SVM para tequilas blancos y destilados de agave.

Muestra	PC1	PC2	#Categoría
DA 01	-21.65	-15.77	1
DA 04	1.31	-9.15	1
DA 10	-11.60	-9.64	1
DA 20	-11.06	-6.98	1
DA 66	-5.92	-6.93	1
TB 4	-8.03	10.88	2
TB 29	-8.58	9.42	2
TB 61	-2.62	6.17	2
TMB 25	12.67	-2.31	2
TMB 31	-4.88	8.70	2
TMB133	-0.06	0.91	2

Figura 59. SVM gaussiano a partir de datos auto-escalados, 1000 interacciones, $C=100$ y sigma de 6 para tequilas blancos y destilados de agave.

7.7.3.1.2 Destilados de agave vs Tequilas Reposados

El modelo se realizó a partir de los datos brutos auto-escalados con un intervalo de 200 a 440 nm. Se utilizó un kernel tipo lineal con una penalización admitida de $C=10$. La **Figura 60** muestra la separación entre los tequilas reposados y destilados de agave, por ende, las muestras de validación fueron predichas correctamente, descritas en la **Tabla 16**.

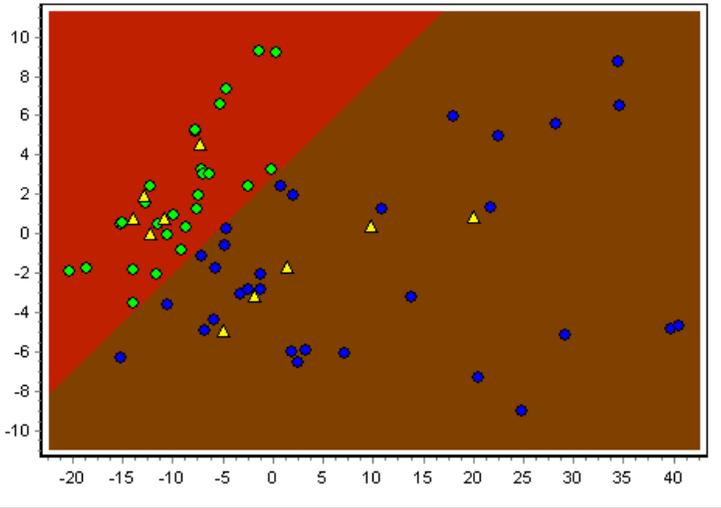


Figura 60. SVM lineal a partir de datos auto-escalados, 1000 interacciones, C=10 para tequilas reposados y destilados de agave.

Tabla 16. Muestras de validacion de SVM para tequilas reposados y destilados de agave.

Muestra	PC1	PC2	Categoría
DA 16	-12.31	0.02	1
DA 21	-10.91	0.75	1
DA 26	-14.02	0.75	1
LA 11	-12.81	1.94	1
LA 49	-7.26	4.59	1
TR 28	19.99	0.84	2
TR 63	-4.89	-4.96	2
TR 76	9.86	0.39	2
TR 111	-1.84	-3.16	2
TMR 27	1.49	-1.69	2

7.7.3.2.2 Destilados de agave vs Tequilas Añejos y Extra-añejos

Para este grupo de muestras no se obtuvo un modelo favorable con ningún tipo de kernel y ni penalizaciones admitidas.

Tabla 17. Parámetros de desempeño de las técnicas supervisadas PCA-DA y KNN.

Técnica	Modelo	Calibración (cross validation)				Validación			
		% Exactitud/ error cv	Precisión	sensibilidad	especificidad	% Exactitud/ error cv	Precisión	sensibilidad	especificidad
PCA-DA	DA/TB	89/0.13	0.85	0.81	0.93	90/0.12	0.88	0.81	0.95
			0.91	0.93	0.81		0.91	0.95	0.81
PCA-DA	DA/TR	91/0.08	0.87	0.96	0.87	90/0.1	0.84	0.96	0.84
			0.96	0.87	0.96		0.96	0.84	0.96
PCA-DA	DA/TA	91/0.11	0.87	0.94	0.91	91/0.11	0.89	0.93	0.90
			0.94	0.87	0.91		0.93	0.90	0.93
KNN (k=1)	DA/TB	90/0.13	0.91	0.78	0.96	91/0.12	0.95	0.78	0.98
			0.90	0.96	0.78		0.90	0.98	0.78
KNN (k=1)	DA/TR	93/0.07	0.93	0.93	0.94	100/ 0.0	1.00	1.00	1.00
			0.94	0.94	0.93		1.00	1.00	1.00
KNN (k=5)	DA/TA	91/0.1	0.87	0.94	0.91	91/0.1	0.91	0.94	0.87
			0.94	0.87	0.91		0.91	0.87	0.94

DA= Destilados de agave TB=Tequilas blancos TR= tequilas reposados TA= Tequilas añejos

Posteriormente, se realizaron los modelos con las técnicas supervisadas PCA-DA y KNN mediante el software Matlab. En este caso los destilados de agave se tomaron como la clase uno y los tequilas auténticos como la clase dos.

La **Tabla 17** resume los resultados de los parámetros de desempeño obtenidos a partir de las técnicas mencionadas, los cuales, fueron satisfactorios para todas las clases puesto que, se acercaban a la unidad; la clase que tuvo mejores modelos con respecto a los parámetros óptimos fue para los tequilas reposados.

7.7.3.2 Análisis discriminante por componentes principales (PCA-DA) con UV-Vis

7.7.3.2.1 Destilados de agave vs tequilas blancos

Para el modelo de PCA-DA se utilizaron datos auto-escalados en un intervalo de 200 a 400 nm; obteniendo el mejor modelo con discriminación lineal y validación cruzada mediante persianas venecianas con cuatro grupos de cancelación y cuatro componentes principales.

El análisis se llevó a cabo con 93 muestras, de las cuales 82 fueron para la calibración-validación interna y 11 muestras para predicción.

Los parámetros de desempeño obtenidos se muestran en la **Tabla 17**. los cuales fueron satisfactorios, los parámetros de predicción dieron la unidad en todos los casos.

El modelo se obtuvo explicando 99 % de varianza total, con una varianza inicial explicada de 61.75 %. En el gráfico de scores sobre los dos primeros componentes principales (**Figura 61**) se nota una separación de las muestras principalmente a lo largo del segundo componente, aunque la forma diagonal indica que los dos PC'S contribuyen a dicha separación.

La mayoría de los destilados de agave se concentran en la parte positiva del diagrama y los tequilas blancos en la parte negativa. Las muestras de predicción (círculos amarillos) se encuentran separadas correctamente.

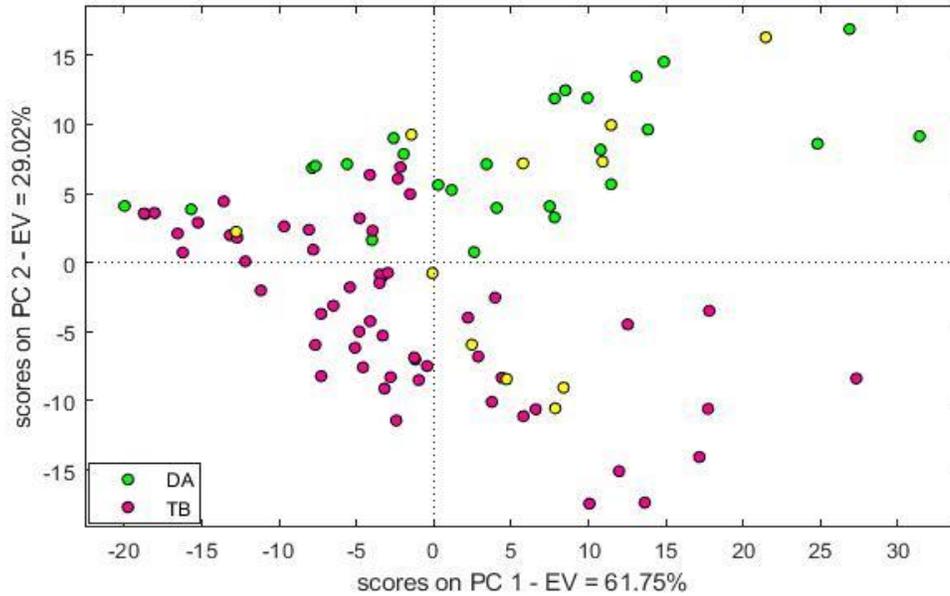


Figura 61. Modelo PCA-DA de tequilas blancos y destilados de agave, gráfico de scores en el plano PC 1 vs. PC 2.

La matriz de confusión nos proporciona que muestras fueron mal clasificadas o fueron no asignadas a algún grupo en el modelo; en la validación, 5 destilados de agave fueron mal asignados (DA02, DA06, DA64, LA23 y LA42) y 2 tequilas blancos (TMB15-A y TMB46-A).

7.7.3.2.2 Destilados de agave vs tequilas reposados

El modelo se obtuvo con datos auto-escalados, intervalo de 200 a 440 nm, discriminación lineal y validación cruzada mediante persianas venecianas con 10 grupos de cancelación y tres componentes principales.

El análisis se llevó a cabo con un total de 67 muestras, de las cuales 58 fueron para la calibración-validación interna y nueve muestras para predicción.

Los parámetros obtenidos en el modelo de calibración-validación interna están indicados en la **Tabla 17**, la mayoría está por arriba del 0.90, los parámetros para la predicción son satisfactorios.

Como se aprecia en la **Figura 62**, PC1 contribuye en mayor parte a la separación de las muestras, el cual tienen una varianza inicial explicada es del 89.92 %.

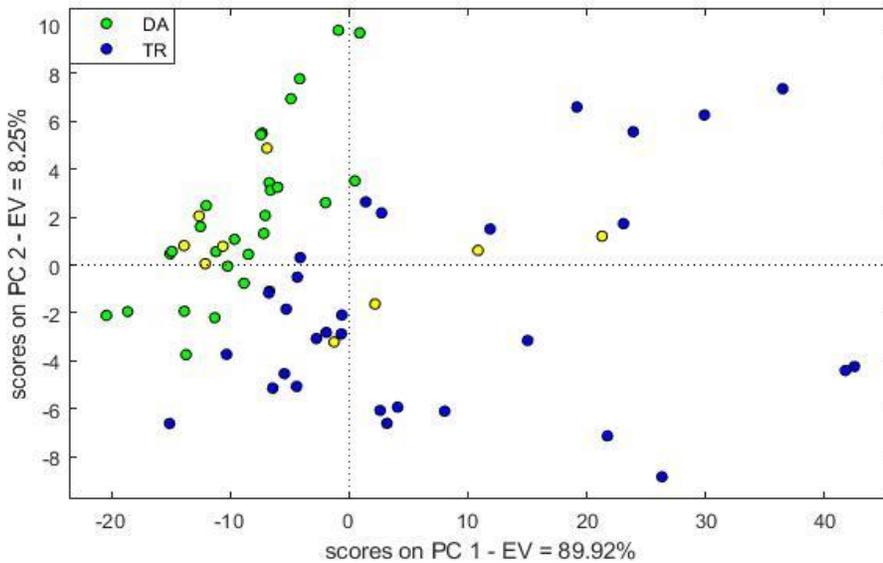


Figura 62. Modelo PCA-DA tequilas reposados y destilados de agave, gráfico de scores en el plano PC 1 vs. PC 2.

La matriz de confusión para la validación, indica que todas las muestras fueron asignadas a un grupo, en la validación para DA y TR fueron uno y cinco muestras mal clasificadas respectivamente, las cuales correspondieron a las muestras: LA 23, TR 77 C, TR79, TR 82, TMR 26 Y TMR 126.

7.7.3.2.3 Destilados de agave vs tequilas añejos

A partir de 54 muestras de calibración, seis para el conjunto de validación y de 190 a 700 nm se obtuvo el mejor modelo con los datos centrados en la media, con una discriminación lineal y validación cruzada mediante persianas venecianas con 10 grupos de cancelación con siete componentes principales.

Los parámetros obtenidos en el modelo de calibración-validación interna están indicados en la **Tabla 17**. la mayoría está por arriba del 0.90, los parámetros para la predicción fueron de 1.0.

Como se aprecia en la **Figura 63**, PC1 contribuye en mayor parte a la separación de las muestras, el cual tienen una varianza inicial explicada es del 97.3 %.

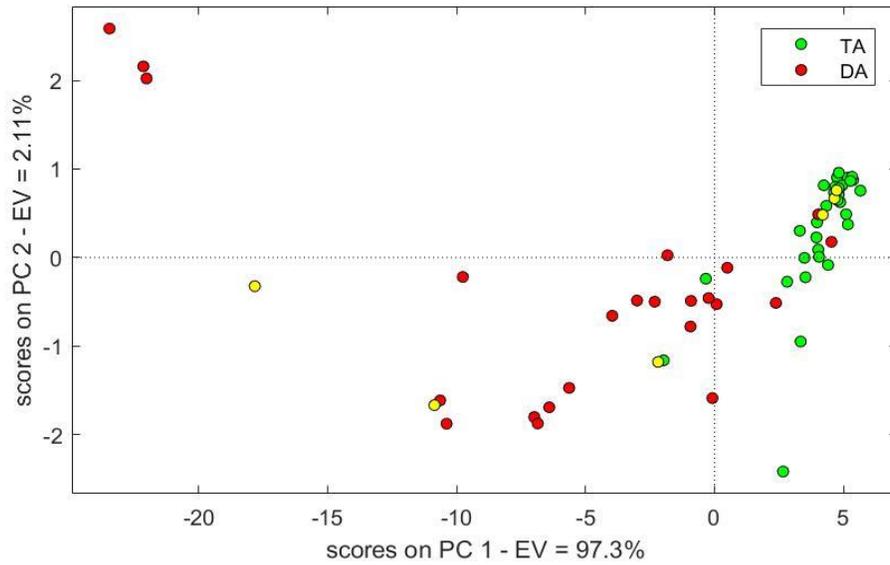


Figura 63. Modelo PCA-DA tequilas añejos y destilados de agave, gráfico de scores en el plano PC 1 vs. PC 2.

7.7.3.3 Vecino más cercano (K-NN) para UV-Vis.

7.7.3.3.1 Destilados de agave vs tequilas blancos

Se utilizaron los datos auto-escalados de 200 a 400 nm, distancia euclídea, validación cruzada con persianas venecianas y 10 grupos de cancelación. La Figura 64 nos indica que la menor tasa de error es con el valor de K de uno o dos, se escogió $k=1$.

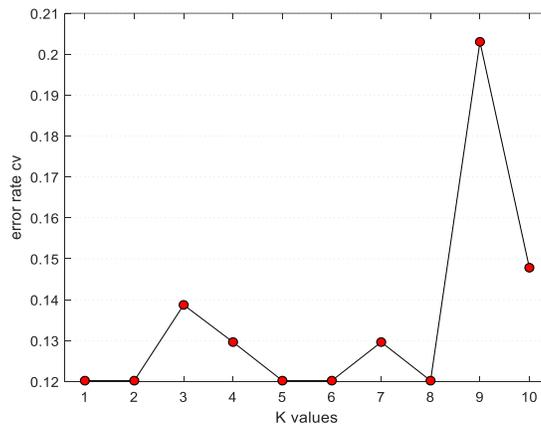


Figura 64. K values vs tasa de error para tequilas blancos.

Los parámetros fueron satisfactorios, indicados en la **Tabla 17**. En la matriz de confusión muestra el número de muestras asignadas a cada grupo; las muestras que fueron clasificadas al grupo no perteneciente son: DA 02, DA 06, DA 21, DA 64, LA 23, LA 42 y TMB 67.

7.7.3.3.2 Destilados de agave vs tequilas reposados

El modelo más satisfactorio para KNN se obtuvo con los datos auto-escalados, 200 a 440 nm, distancia Euclídea, validación cruzada con persianas venecianas y dos grupos de cancelación; la **Figura 65** nos indica que la menor tasa de error es con el valor de K de uno o dos, se eligió $k=1$.

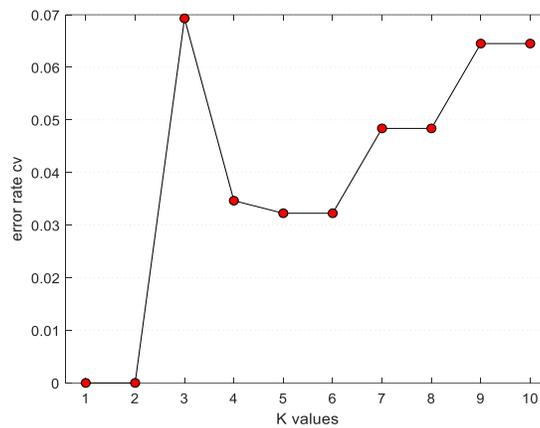


Figura 65. K values vs tasa de error para tequilas reposados.

Los parámetros obtenidos fueron excelentes, indicados en la **Tabla 17**, para la validación y predicción se obtuvo en todos los casos la unidad y el 100 % de exactitud.

Como lo indica la matriz de confusión (**Tabla 18**) todas las muestras fueron correctamente asignadas a las clases que pertenecen.

Tabla 18. Matriz de confusión para tequilas reposados

Clases	Clasificados correctamente	Clasificados incorrectamente	No clasificados
DA	27	0	0
TR	31	0	0

7.7.3.3.3 Destilados de agave vs tequilas añejos

El modelo óptimo de KNN previamente se obtiene con la determinación del valor óptimo para K.

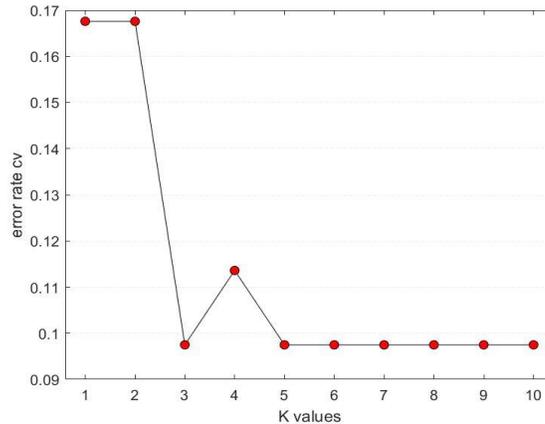


Figura 66. K values vs tasa de error para tequilas añejos.

Este parámetro por lo general se selecciona después de la optimización donde se usan procedimientos de validación cruzada. Los resultados del modelo óptimo se describen en la siguiente Tabla 17. Para esta clase los parámetros de predicción no fueron la unidad, pero se consideran aceptables (Tabla 19).

Tabla 19. Parámetros para predicción del modelo óptimo de K-NN para tequilas añejos.

Predicción (test)					
DA	0.94	0.87	0.91	0.91	0.10
TA	0.87	0.94	0.91		

Para conocer la precisión del algoritmo a través de una evaluación de la matriz de confusión en cual se evalúan falsos positivos, verdaderos positivos y positivos incorrectos, estos se observan en la siguiente Tabla 20.

Tabla 20. Matriz de confusión del modelo K-NN para tequilas añejos.

Clases	Clasificados correctamente	Clasificados incorrectamente	No clasificados
DA	29	2	0
TA	20	3	0

7.8 Análisis quimiométrico para HPLC

Con los datos obtenidos por HPLC, de las áreas en función del tiempo, se realizó un breve análisis exploratorio, para comparar las mejoras al utilizar una técnica más específica con relación al análisis de compuestos furanos.

7.8.1 Análisis de componentes principales (PCA) con HPLC

Dado que la altura (áreas) de los picos es diferente para cada clase, se prosiguió con el mismo procedimiento (UV-Vis) de realizar el análisis por separado para cada clase. Se utilizaron todos los datos de áreas en función del tiempo correspondiente a cada compuesto furánico, obtenidos del cromatograma, con el fin de encontrar intervalos que dieran una separación satisfactoria.

7.8.1.1 Destilados de agave vs tequilas blancos

Modelo óptimo

El modelo óptimo se obtuvo con datos brutos auto-escalados, tomando ventanas de tiempo, de 2 a 4.5 min de 6 a 6.8 min y de 8 a 8.5 min (correspondientes a los picos del furfural y 2-acetilfurano, respectivamente). Se descartaron 4 muestras: DA 28, DA 29, LA 42 y DA 64.

En la **Figura 67 (a)** se muestran los scores en el subespacio PC1-PC2, donde se observa la separación entre los tequilas blancos y destilados de agave, principalmente sobre el eje de PC2. Los tres primeros PC's explican un 70.27 % de la varianza inicial (PC1: 43.65 %, PC2: 18.51 %, PC3: 8.11 %). La **Figura 67 (b)** se visualiza la separación en el subespacio PC1-PC2-PC3.

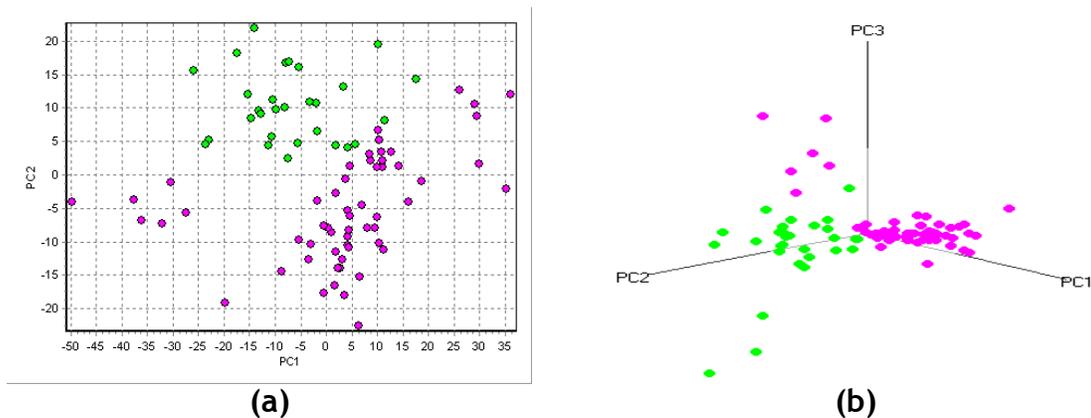


Figura 67. Diagrama de scores de PCA, subespacio PC1-PC2. Tequilas blancos y destilados de agave con datos auto-escalados; intervalos de 2-4.5 min de 6-6.8 min y de 8-8.5 min.

(a) Subespacio PC1-PC2, (b) Subespacio PC1-PC2-PC3.

7.8.1.2 Destilados de agave vs tequilas reposados

Modelo óptimo

El modelo se obtuvo con datos brutos auto-escalados, tomando una ventana de tiempo de 7.2 a 11 min, que corresponden a los picos 2-acetilfurano y 5-metilfurfural. Se desactivaron las muestras DA 28, LA 14, TR 19 y TMR 76.

Se observa la separación entre los tequilas reposados y destilados de agave, sobre el subespacio PC1 y PC2, mostrado en la **Figura 68 (a)**. Los tres primeros PC's explican un 85.98 % de la varianza inicial (PC1: 75.08 %, PC2:6.88 %, PC3: 4.02 %). La **Figura 68 (b)** se visualiza la separación en el subespacio PC1-PC2-PC3.

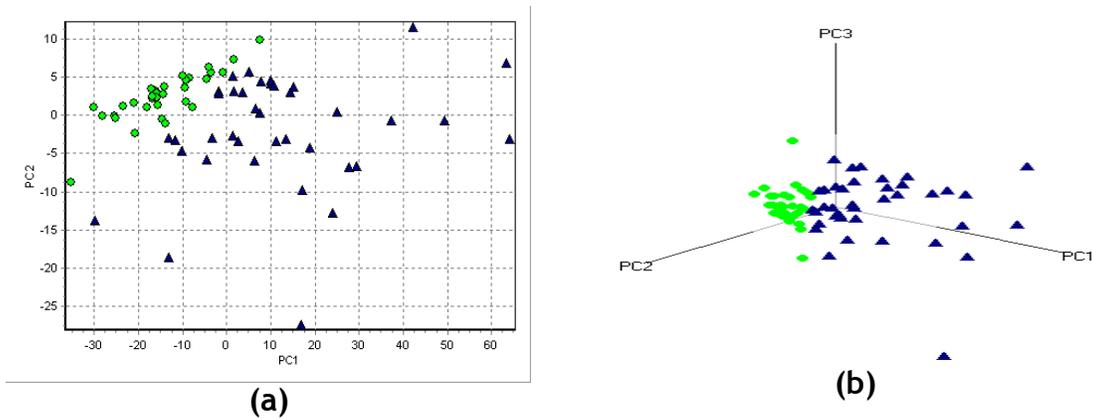


Figura 68. Diagrama de scores de PCA de tequilas reposados y destilados de agave Subespacio PC1-PC2. Datos auto-escalados, intervalo de 2-4.5 min de 6-6.8 min y de 8-8.5min. (a) Subespacio PC1-PC2, (b) Subespacio PC1-PC2-PC3.

7.8.1.3 Destilados de agave vs tequilas añejos

Modelo óptimo

Para obtener el mejor modelo se decidió utilizar sólo las ventanas de tiempo correspondientes a las muestras de interés, sin el tiempo muerto ni la cola de la lectura. Con los datos brutos auto-escalados en el espacio PC2 y PC1 fue posible observar la separación de los grupos, a diferencia de los destilados. Los tres primeros PC's explican un 90.84 % de la varianza inicial (PC1: 75.52 %, PC2:8.88 %, PC3: 6.44 %). En la **Figura 69 (b)** se visualiza la separación en el subespacio PC1-PC2-PC3.

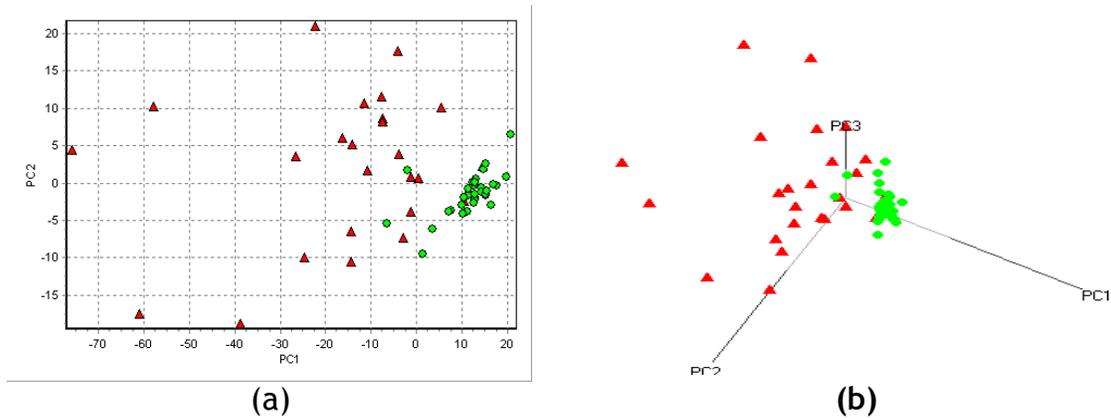


Figura 69. Diagrama de scores de PCA de tequilas añejos/extra-añejos y destilados de agave con datos auto-escalados, intervalo de 4 -6.84 min y de 8.21- 9 min. (a) subespacio PC1-PC2. (b) subespacio PC1-PC2-PC3.

Para los tequilas blancos y reposados, se obtuvieron separaciones más evidentes que en los añejos, de modo que, estos modelos mejoraron con respecto a los obtenidos en UV-Vis.

En base a los modelos de exploración con HPLC, el intervalo de tiempo óptimo indica que el compuesto furánico influye más en la separación para cada modelo. Visualmente la forma en que se separan los tequilas de los destilados sobre PC1-PC2, son semejantes a los modelos con UV-Vis, indicando que las variables que influyen para la separación son el contenido furánico, se requiere estudiar los modelos más a detalle (con modelos supervisados) para corroborar lo mencionado, aunque la cuantificación por HPLC lo comprueba.

Para la obtención de modelos quimiométricos, al comparar tiempos de análisis, costos y procesamiento de datos, la técnica UV-Vis resulta más factible que HPLC.

8. CONCLUSIONES

Se realizó un análisis exploratorio a partir de matrices de datos brutos, primera y segunda derivada con el fin de diferenciar entre tequilas auténticos y destilados de agave por medio de las técnicas no supervisadas, Análisis de Componentes Principales (PCA) y Análisis Clúster (CA), a partir de datos de UV-Vis. Dichos modelos se obtuvieron con datos brutos auto-escalados. En general, todos los modelos fueron satisfactorios.

Los espectros de absorción presentan una banda característica alrededor de 280 nm cuya intensidad está relacionada con el contenido de compuestos furánicos. En este sentido, fueron encontradas pautas internas de los correspondientes scores, cuyas tendencias coincidieron con dicho aumento.

Se desarrolló un método cromatográfico para cuantificar los furfurales presentes en tequilas y destilados de agave. Las condiciones cromatográficas óptimas fueron; columna Eclipse XDB- C18 15 cm (5 μ m, 4.6 x 250 mm), T=40 °C, flujo 1ml/min, volumen de inyección 20 μ L, gradiente lineal: 0 min 10 % A, 10 min 70 % A. λ = 280 nm.

En cuanto a los tequilas, el 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) no se detectó en los tequilas blancos, mientras que 5-metilfurfural (5-MF) y el furfural (FUR) predominan en todas las clases. No obstante, en la literatura se reporta que es el contenido de 5-hidroximetilfurfural, además de la vainillina y el siringaldehído, el que se incrementa con el tiempo de reposo.

Se puso en evidencia que los contenidos globales de compuestos furánicos son superiores en los tequilas auténticos con respecto a los destilados de agave. Esto se podría deber a la falta de regulación de los destilados por lo que no cuentan con denominación de origen. Por ejemplo, su fermentación podría emplearse otros tipos de agave, así como otras fuentes de azúcares en un porcentaje mayor al 49 %.

Con la prueba no paramétrica, Kruskal Wallis, se constató una diferencia significativa entre los tequilas auténticos y los destilados con el 95 % de confianza.

Entre las técnicas supervisadas, se realizaron modelos con Support Vector Machines (SVM), Análisis Discriminante por Componentes Principales (PCA-DA) y Vecino más cercano (K-NN) a partir de datos UV-Vis, cuyos resultados permitieron predecir satisfactoriamente la mayor parte de las muestras.

Por otra parte, también se generaron modelos a partir de matrices conformadas por datos de HPLC, de las áreas en función del tiempo, los cuales fueron capaces de diferenciar entre cada clase y los destilados. Esto puso en evidencia que la presencia de compuestos furánicos es capaz de diferenciar los tequilas auténticos de los destilados de agave.

La presente tesis propone una serie de estrategias quimiométricas e instrumentales novedosas, económicas y viables para llevar a cabo la diferenciación de tequilas auténticos y destilados de agave, que podrían ser de utilidad para el Consejo Regulador del Tequila CRT u otras instancias relacionadas con la producción y comercialización del tequila.

9. REFERENCIAS

- [1]. Sistema de Lisboa. (1958). Reseña del Arreglo de Lisboa relativo a la Protección de las Denominaciones de Origen y su Registro Internacional. 30/09/2018, de Organización Mundial de la Propiedad Intelectual. Sitio web: http://www.wipo.int/treaties/es/registration/lisbon/summary_lisbon.htm
- [2]. Aguilar R.M. El director general de normas. (2005). Norma oficial mexicana NOM-006-SCFI-2005, Bebidas alcohólicas- Tequila especificaciones. 10/09/2018, de Secretaría de Economía. Sitio web: <https://www.crt.org.mx/images/Documentos/NOM-006-SCFI-2005.pdf>
- [3]. Ramos T. R. (1994). Norma oficial mexicana NOM-070-SCFI-1994. Bebidas alcohólicas- Mezcal. Especificaciones. 10/09/2018, de Secretaría de Comercio y Fomento Industrial Sitio web: <http://www.colpos.mx/bancodenormas/noficiales/NOM-070-SCFI-1994.PDF>
- [4]. Aguilar R. M. El director general de normas. (2004). Norma oficial mexicana NOM-168-SCFI-2004, Bebidas alcohólicas-Bacanora-Especificaciones de elaboración, envasado y etiquetado. 10/09/2018, de Secretaría de Economía Sitio web: <https://dof.vlex.com.mx/vid/scfi-alcoholicas-bacanora-ensado-28151559>
- [5]. Carrillo L. A. T. (2007). Los Destilados de Agave en México y su denominación de origen. Ciencias 87. 40-41.
- [6]. Téllez M. P. (1998). El Cocimiento, una Etapa Importante en la Producción del Tequila. Bebidas Mexicanas 7(1), p.19-20.
- [7]. Mendoza García A.J. (2018). Boletín UNAM-DGCS-045 Ciudad Universitaria.28/02/19 De DGCS sitio web: http://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2018_045.html
- [8]. Christoph B. C.; Christoph N.; Aguilar Cisneros O.B.; López G. M.; Richling E.; Rossmann A. y Schereir P. (2003). Authentication of tequila by gas chromatography and stable isotope ratio analyses. Eur. Food Res. Technol. 217. 438.
- [9]. Lachenmeier W.D., Richling E., López G.M., Frank W. y Schreier P. (2005). Multivariate analysis of FTIR and ion chromatographic data for the quality control of tequila. J. Agric. Food Chem. 53, 2151.
- [10]. Aguilar Cisneros O.B.; López G.M.; Richling E.; Heckel F y Schreier P. (2002). Tequila authenticity assessment by headspace SPME-HRGC-IRMS analysis of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ and $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ratios of ethanol. J. Agric. Food Chem. 50, 7520.

- [11]. Muñoz C.A.; Adam C. G.; Humberto G. P. y Jesús C.M. (2008). Development and validation of a High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detection method for the determination of aging markers in tequila. *Journal of Chromatography A*, 1213 Pg.218-223.
- [12]. Mangas J.; Rodríguez R.; Moreno J.; Suárez B. y Blanco D. (1996). Evolution of Aromatic and Furanic Congeners in the Maturation of Cider Brandy: A Contribution to Its Characterization. *J. Agric. Food Chem.* 44, 3303.
- [13]. Salazar J.,(2013).Comercio internacional.
- [14]. OMPI. (26 de 08 de 2020). Organización Mundial de la Propiedad Intelectual Obtenido de https://www.wipo.int/geo_indications/es/about.html
- [15]. CRT. (2019). Proceso de elaboración del tequila. 10/07/19 de Consejo Regulador del Tequila. Sitio web: <https://www.crt.org.mx/>
- [16]. Castro Diaz A.S y Guerrero Beltrán J.A. (2013). El agave y sus productos. 28/02/19 de Universidad de las Americas Puebla sitio web: <http://web.udlap.mx/tsia/files/2014/12/TSIA-72-Castro-Diaz-et-al-2013.pdf>
- [17]. García Herrera E. J.; Méndez-Gallegos S. J. y Talavera-Magaña D. (2010). El género agave spp. en México: principales usos de importancia socioeconómica y agroecológica. *RESPYN Revista Salud Pública y Nutrición*, Edición Especial No. 5-2010 (ISSN 1870-0160)
- [18]. Adriana Vázquez García, Mario Aliphath Fernández, El maguey pulquero, una planta multifuncional y polifacética: los usos desde una visión mestiza e indígena. *Scripta Ethnologica*, XXXVIII,65-87. [fecha de Consulta 4 de Marzo de 2020]. ISSN: 0325-6669. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=148/14849184004>
- [19]. Zizumbo V. Daniel y Colunga G. Patricia. (2007). La introducción de la destilación y el origen de los mezcales en el occidente de México.
- [20]. Pérez Hernández E., Chávez Parga Ma. C., González Hernández J.C. (2016) Revisión del agave y el mezcal. 10/07/19 de *Rev. Colomb. Biotecnol.* Vol. XVIII No. 1 sitio web: <http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v18n1/v18n1a16.pdf>
- [21]. Esqueda Valle M.; Coronado Andrade M.; Gutiérrez Saldaña A. y Frago Gadea T. Agave angustifolia Haw. Técnicas para el trasplante de vitroplantas a condiciones de agostadero. 28/02/19 de SAGARPA. Sitio web: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/168835/Agave_angustifolia_Haw._T_cnicas_para_el_Transplante_de_Vitroplantas_a_Condiciones_de_Agostadero.pdf
- [22]. Vera Guzmán A. M.; Santiago García P. A. y G. López M. (2009). Compuestos volátiles aromáticos generados durante la elaboración de mezcal de Agave

- angustifolia y Agave potatorum. Rev. Fitotec. Mex. Vol. 32 (4): 273 - 27. Sitio web: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rfm/v32n4/v32n4a5.pdf>
- [23]. García Marín P.C.; Zizumbo Villarreal D. y Martínez Torres J. (2007) Tradiciones en el aprovechamiento de los agaves mexicanos: una aportación a la protección legal y conservación de su diversidad biológica y cultural. 10/07/19 de Unidad de Recursos Naturales. Centro de Investigación Científica de Yucatán.pg 237
- [24]. Procuraduría federal del consumidor. (2018). El Tequila, un regalo de México para el mundo.
- [25]. Bautista Justo M.; García Oropeza L.; Barboza Corona J. E. y Parra Negrete L. A. (2001). EL Agave tequilana Weber y la producción de tequila. 28/02/19 de acta universitaria. Sitio web: <http://www.actauniversitaria.ugto.mx/index.php/acta/article/viewFile/301/278>
- [26]. Turegano Roldan c. (2012). NORMA Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-2012, Bebidas alcohólicas-Tequila-Especifica. 01/06/2019 de Diario Oficial de la Federación sitio web: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5282165&fecha=13/12/2012
- [27]. Lappe Olveras P.; Moreno Terrazas R.; Arrison Gabino J.; y Herrera Suarez T. (2008) Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic nondistilled and distilled Agave beverages.FEMSYeast Research.
- [28]. Pastoriza de la Cueva S. (2013). Efecto de la ingesta de compuestos avanzados de la reacción de Maillard sobre el metabolismo intestinal (Tesis doctoral). Universidad de Granada. España. Disponible en: <https://hera.ugr.es/tesisugr/21915076.pdf>
- [29]. Bautista Justo, M.; García Oropeza, L.; Salcedo Hernández, R. y Parra Negrete, L. A. (2001). Azúcares en agaves (agave tequilana Weber) cultivados en el estado de Guanajuato. Acta Universitaria, vol. 11, núm. 1, abril, pp. 33-38.
- [30]. León Rodríguez De A.; Gonzalez Hernandez L.; Barba de la Rosa A.; Escalante Minakata P. y G. Lopez M. (2006) Characterization of volatile compounds of mezcal, and ethnic alcoholic beverage obtained from agave salmiana. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 54, 1337-1341.
- [31]. Rivera S. M. y Aguilera R. J. (2000). Propiedades Físicas y Termodinámicas del Furfural. Tecnología Química Vol. XX, No. 1,83. (Primera parte). Universidad de Oriente.Sitio web: <https://www.ecured.cu/Furfural>

- [32]. Chemical book. 67-47-0(5-Hydroxymethylfurfural) Product Description. 10/10/19 sitio web:
https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_US_CB6266813.aspx
- [33]. VWR International, LLC. 2-Acetilfurano >99%. Sitio web:
<https://es.vwr.com/store/product/7195416/2-acetilfurano-99>
- [34]. B. B. Jhon Elmer y C. Luis Mauricio. (2010). Estandarización de la técnica espectrofotométrica (uv-vis) para la cuantificación de antraquinonas presentes en productos a base de aloe vera. Licenciatura. Universidad Tecnológica de Pereira.
- [35]. C. E. María Luisa de; Marta I. L.; María W. y Vilma M. (2009). Metodologías analíticas para la determinación y especiación de As en aguas y suelos. Ed: CYTED.
- [36]. G. M. Rosario (2008). Foto degradación de productos plásticos elaborados con polietileno lineal de baja densidad. Doctoral. Posgrado interinstitucional en ciencia y tecnología.
- [37]. J. Chem. Inf. Comput. Sci., 1975, 15 (4), pp 201-203 Publication Date: November 1975
- [38]. R. B. Raúl; C. R Francesca; E. P. Sara; G. T. Francisco Javier; G. P. Bernardino y Rosa M. (2017). Desarrollo de procedimientos de medida basados en la cromatografía líquida de alta resolución. Rev Lab Clin. 2018;11(3):137-146.
<https://doi.org/10.1016/j.labcli.2017.05.001>
- [39]. Guía Eurolab España. P.P. Morillas y colaboradores. Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos - Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados (1ª ed. 2016). Sitio web:
https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_ES.pdf
- [40]. Swartz E. Michael e Ira S. Krull. (2012). Analytical validation. Taylor y Francis Group. Boca Raton London New York.
- [41]. Farmacopea Argentina 7° Ed. Vol. I - ANMAT. Sitio web:
http://www.anmat.gov.ar/webanmat/fna/flip_pages/Farmacopea_Vol_I/files/asets/basic-html/page441.html
- [42]. Consulta a usuarios de la FEUM. (2019-2). Validación de métodos analíticos. Sitio web: <https://www.farmacopea.org.mx/Repositorio/Documentos/679.pdf>
- [43]. Aroca R. Pedro, Lázaro G. Carlos, G. L. Julio José. (2013). Manual de investigación clínica. Capítulo 21. San Luis Potosí: Manual Moderno.

- [44]. Amat R. Joaquin. (2016). Análisis de Normalidad: gráficos y contrastes de hipótesis. 21 de octubre 2020 , de Creative Commons Attribution 4.0 International License. Sitio web:
https://www.cienciadedatos.net/documentos/8_analisis_normalidad
- [45]. Grupo de Petrología Aplicada. (1996-2020). ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA Y TEST DE NORMALIDAD. 21 de Octubre del 2020, de Universidad Alicante Sitio web: <https://web.ua.es/es/lpa/docencia/analisis-estadistico-de-datos-geoquimicos-con-r/estadistica-descriptiva-y-test-de-normalidad.html>
- [46]. Minitab 18. (2019). Provea de normalidad. 21 de octubre del 2020 Sitio web:<https://support.minitab.com/es-mx/minitab/18/help-and-how-to/statistics/basic-statistics/supporting-topics/normality/test-for-normality/>
- [47]. Amat R. Joaquín. (2016). Kruskal-Wallis test. 21 de octubre 2020, de Creative Commons Attribution 4.0 International License. Sitio web:
https://www.cienciadedatos.net/documentos/20_kruskal-wallis_test
- [48]. Castillo Martínez M. (2007). Aplicación de la Espectroscopia NIR al Control Analítico de Procesos de la Industria Química (Tesis doctoral). Universidad Autónoma de Barcelona. España.
- [49]. Peguero Gutiérrez A. (2010). La espectroscopia NIR en la determinación de propiedades físicas y composición química de intermedios de producción y productos acabados (Tesis doctoral). Universidad Autónoma de Barcelona. España. Sitio web:
<https://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/3316/apg1de1.pdf?sequence=1>
- [50]. Ximenez Gómez M. C. y San Martín Castellanos R. (2013). Fundamentos de las técnicas multivariantes. Universidad Nacional de Educación a Distancia, Madrid.
- [51]. Mesa Ramos L.; Gozá León O.; Uranga Machado M.; Toledo Rivero A. y Gálvez Torriente Y. (2018). Aplicación del Análisis de Componentes Principales en el proceso de fermentación de un anticuerpo monoclonal. Vaccimonitor vol.27 no.1 Ciudad de la Habana
- [52]. Fernández F. R.; Dago M. A y Linchenat D. E. (2009). Desarrollo de un modelo SIMCA de reconocimiento de patrones para la clasificación de combustible diesel. Tecnología Química, XXIX (Mayo-Agosto). 07/09/2018. Sitio web: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=445543759005> ISSN 0041-8420.
- [53]. Swarbrick, B. (Ed.). (2012). Multivariate Data Analysis For Dummies®, (Special Ed.). West Sussex, England: WILEY.

- [54]. Ceballos Magaña S.G. (2007). Caracterización analítica de destilados de agave tequilana mediante técnicas de análisis multivariante (Tesis doctoral). Universidad de Sevilla, España.
- [55]. Alaminos Chica A.; Frances Garcia F. J.; Penalva Verdú C. y Santacreu Fernandez O. A. (2015). Análisis multivariante para las ciencias sociales I. Índices de distancia, conglomerados y análisis factorial, Cuenca, Ecuador:PYDLOS EDICIONES.
- [56]. Todeschini, R. (2016). Classification Toolbox for Matlab - versión 4.2., de Milano Chemometrics and QSAR Research Group, Recuperado 12/09/18, Sitio web:
http://michem.disat.unimib.it/chm/download/software/help_classification/index.htm
- [57]. A. Betancourt Gustavo. (2005). Las máquinas de soporte vectorial (SVMs). Scientia et Technica Año XI, No 27. UTP. ISSN 0122-1701
- [58]. Otto, M. O. (2016). Chemometrics: Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry. (3ª ed.). <https://doi.org/10.1002/9783527699377>.
- [59]. Pérez J. L. (2013). Análisis discriminante. 09/09/2018, de Sitio web:
<https://estadisticaorquestainstrumento.wordpress.com/2013/01/04/tema-20-analisis-discriminante/>.
- [60]. Sancho C. Fernando. (2019). Aprendizaje Supervisado y No Supervisado. Sitio web: <http://www.cs.us.es/~fsancho/?e=77>
- [61]. Contreras L. U.; Barbosa G. O.; Ramos O.; Pichardo M.; Meneses N. y Maldonado J.L. (2008). Identificación y discriminación de Tequilas reposados in situ para la protección de marca. Sitio web:
<http://novascientia.delasalle.edu.mx/ojs/index.php/Nova/article/view/230/128>
- [62]. Muñoz Muñoz Ana C.; Pichardo Molina Juan L.; Ramos Ortiz Gabriel; Barbosa García Oracio; José L. Maldonado; Marco A. Meneses Nava; Nancy E. Ornelas Soto; Antonio Escobedo y Pedro L. López de Alba. (2010). Identification and Quantification of Furanic Compounds in Tequila and Mezcal using Spectroscopy and Chemometric Methods. Journal of the Brazilian Chemical Society. Vol.21, No. 6, 1077-.

ANEXOS

Anexo I. Cálculo para la preparación de las soluciones STOCK

→ 5-Hidroximetilfurfural

$$0.035g \text{ R.A.} \frac{(100g \text{ R.P.})(1000mg)}{(99g \text{ R.A.})(1g)(0.005L)} = 7070.71 \frac{mg}{L}$$

$$\left(\frac{0.035 g \text{ R.A.}}{0.005 L \text{ f.m.}}\right) \left(\frac{100g \text{ R.P.}}{99g \text{ R.A.}}\right) = 7070.71 \frac{mg}{L}$$

→ Furfural

$$0.046g \frac{(100g)(1000mg)}{(99g)(1g)(0.005L)} = 9292.93 \frac{mg}{L}$$

$$\left(\frac{0.046 g \text{ R.A.}}{0.005 L \text{ f.m.}}\right) \left(\frac{100g \text{ R.P.}}{99g \text{ R.A.}}\right) = 9.29293 \frac{g}{L} \left(\frac{1000 mg}{1 g}\right) = 9292.93 \frac{mg}{L}$$

→ 2-Acetilfurano

$$0.038g \frac{(100g)(1000mg)}{(99g)(1g)(0.005L)} = 7676.77 \frac{mg}{L}$$

$$\left(\frac{38 mg \text{ R.A.}}{0.005 L \text{ f.m.}}\right) \left(\frac{100g \text{ R.P.}}{99g \text{ R.A.}}\right) = 7676.77 \frac{mg}{L}$$

→ 5-metilfurfural

$$0.054g \frac{(100g)(1000mg)}{(99g)(1g)(0.005L)} = 10909.1 \frac{mg}{L}$$

$$\left(\frac{0.054 g \text{ R.A.}}{0.005 L \text{ f.m.}}\right) \left(\frac{100g \text{ R.P.}}{99g \text{ R.A.}}\right) = 10.9091 \frac{g}{L} \left(\frac{1000 mg}{1 g}\right) = 10909.1 \frac{mg}{L}$$

Anexo II. Cálculo para la preparación de las soluciones estándar a 200 mg/L

→ 5-hidroximetilfurfurdal

$$7070.71 \frac{mg}{L} \left(\frac{0.283 mL \text{ stock}}{10 mL \text{ f.m.}} \right) = 200.10 \frac{mg}{L}$$

→ Furfural

$$9292.93 \frac{mg}{L} \left(\frac{0.215 mL \text{ stock}}{10 mL \text{ f.m.}} \right) = 199.80 \frac{mg}{L}$$

→ 2-Acetilfurano

$$7676.77 \frac{mg}{L} \left(\frac{0.260 mL \text{ stock}}{10 mL \text{ f.m.}} \right) = 199.60 \frac{mg}{L}$$

→ 5-metilfurfural

$$10909.1 \frac{mg}{L} \left(\frac{0.183 mL \text{ stock}}{10 mL \text{ f.m.}} \right) = 199.64 \frac{mg}{L}$$

Anexo III. Preparación de las soluciones estándar para la curva de calibración

Volumen añadido de cada soln. estándar (µL)						
Sistema	5-HMF [10 mg/L]	FUR [10 mg/L]	2-AF [10 mg/L]	5-MF [10 mg/L]	Aforo (ml)	Concentración [mg/L]
1	50	50	50	50	5	0.1
2	250	250	250	250	5	0.5
3	500	500	500	500	5	1
Sistema	5-HMF	FUR	2-AF	5-MF	Aforo	Concentración

	[200 mg/L]	[200 mg/L]	[200 mg/L]	[200 mg/L]	(ml)	[mg/L]
4	75	75	75	75	5	3
5	125	125	125	125	5	5
6	250	250	250	250	5	10
7	375	375	375	375	5	15
8	500	500	500	500	5	20
9	625	625	625	625	5	25

Anexo IV. Curva de calibración

Concentración [mg/L]	Respuesta de análisis cromatográfico (UA)			
	5-HMF	FUR	2-AF	5-MF
25	4678.0	2069.9	3236.6	2565.1
	4630.1	3057.5	3120.7	2522.8
20	3583.6	2547.4	2646.6	1949.8
	3651.1	2554.8	2714.4	2014.7
15	2590.9	1984.1	2128	1462.6
	2604.5	1982.8	2119.6	1456.8
10	1964.3	1117.8	1164.7	1096.9
	1939.3	1086.4	1175.7	1065.6
5	1005.2	672.3	718.8	579.2
	1004.0	673.4	718.1	577.8
3	497.4	371.7	385.5	285.9
	502.4	364.5	393.2	291.2
1	184.0	56.3	62.0	112.6
	173.7	118.2	128	104.2
0.5	99.6	54.9	57.6	54.2
	94.9	53.1	57.4	51.6
0.1	19.5	11.7	12.7	7.4
	21.2	11.4	11.9	7.9

Anexo V. Resultados de repetibilidad interdía para 5-HMF

Muestra	Día	Concentración	Área	Media	Coefficiente de variación
5-HMF	1º Día	1 (mg/L)	179.2	177.9	0.98%
			178.5		
			175.9		
	2º Día	1 (mg/L)	104.1	105.2	1.23%
			106.6		
			104.8		
	3º Día	1 (mg/L)	116.2	111.5	3.22%
			106.8		
			111.6		
Promedio			131.5	1.81%	
5-HMF	1º Día	10 (mg/L)	1699.8	1767.2	3.39%
			1787		
			1814.7		
	2º Día	10 (mg/L)	1070	1108.6	3.06%
			1133.7		
			1122.1		
	3º Día	10 (mg/L)	1488.3	1485.7	0.59%
			1492.9		
			1475.8		
Promedio			1453.8	2.35%	
Coefficiente de variación promedio: 2.08%					

Anexo VI. Resultados de repetibilidad interdía para FUR

Muestra	Día	Concentración	Área	Media	Coefficiente de variación
FUR	1º Día	3 (mg/L)	380	382.47	0.57%
			383.3		
			384.1		
	2º Día	3 (mg/L)	226.1	243.37	6.17%
			250.6		
			253.4		
	3º Día	3 (mg/L)	269.9	268.5	0.46%
			267.5		
			268.1		
Promedio			298.1133333	2.40%	
FUR	1º Día	15 (mg/L)	1881.6	1895.2	1.15%
			1883.6		
			1920.4		
	2º Día	15 (mg/L)	1270.2	1315.07	3.04%
			1347.2		
			1327.8		
	3º Día	15 (mg/L)	2039.3	2019.03	1.57%

			2035.2		
			1982.6		
	Promedio			1743.1	1.92%
Coeficiente de variación promedio: 2.16 %					

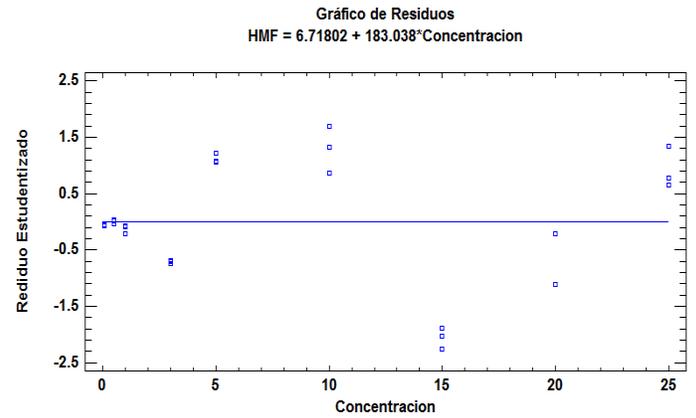
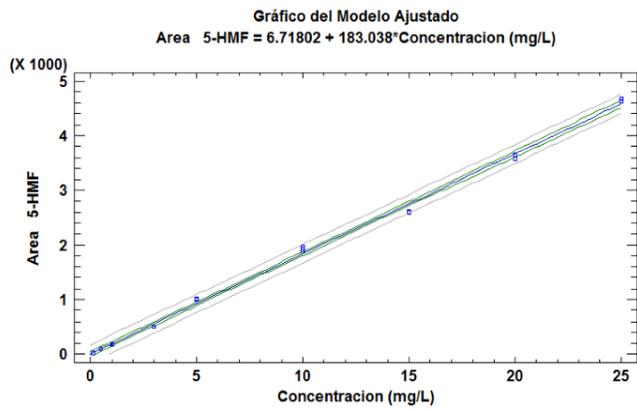
Anexo VII. Resultados de repetibilidad interdía para 2-AF

Muestra	Día	Concentración	Área	Media	Coeficiente de variación
2-AF	1º Día	3 (mg/L)	403.9	404.2	0.36%
			402.9		
			405.8		
	2º Día	3 (mg/L)	305.8	334.23	7.63%
			341.8		
			355.1		
	3º Día	3 (mg/L)	360.1	357	0.75%
			355.6		
			355.3		
Promedio			365.1433333	2.91%	
2-AF	1º Día	15 (mg/L)	2010.4	2021.73	1.34%
			2002.1		
			2052.7		
	2º Día	15 (mg/L)	1799.1	1818.97	1.68%
			1854.2		
			1803.6		
	3º Día	15 (mg/L)	2228.4	2209.67	1.39%
			2226.6		
			2174		
Promedio			2016.79	1.47%	
Coeficiente de variación promedio: 2.19 %					

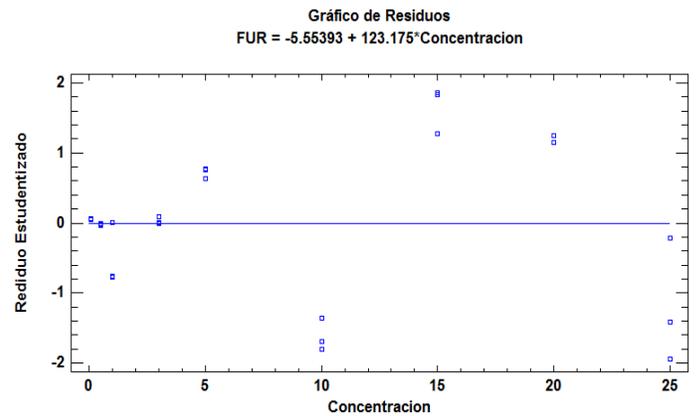
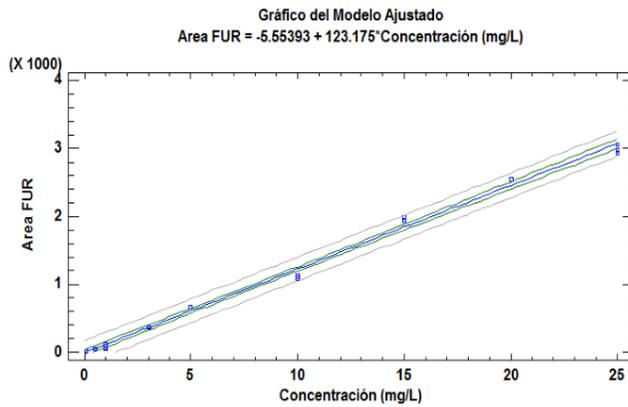
Anexo VIII. Resultados de repetibilidad interdía para 5-MF

<i>Muestra</i>	<i>1º Día</i>	<i>Concentración</i>	<i>Área</i>	<i>Media</i>	<i>Coefficiente de variación</i>
<i>5-MF</i>	<i>1º Día</i>	<i>1 (mg/L)</i>	<i>100.9</i>	<i>102.37</i>	<i>4.09%</i>
			<i>99.1</i>		
			<i>107.1</i>		
	<i>2º Día</i>	<i>1 (mg/L)</i>	<i>90.5</i>	<i>92.93</i>	<i>2.41%</i>
			<i>94.9</i>		
			<i>93.4</i>		
	<i>3º Día</i>	<i>1 (mg/L)</i>	<i>104.2</i>	<i>103.1</i>	<i>2.10%</i>
			<i>100.6</i>		
			<i>104.5</i>		
	<i>Promedio</i>			<i>99.47</i>	<i>2.87%</i>
<i>5-MF</i>	<i>1º Día</i>	<i>10 (mg/L)</i>	<i>949.2</i>	<i>1008.47</i>	<i>5.26%</i>
			<i>1024.5</i>		
			<i>1051.7</i>		
	<i>2º Día</i>	<i>10 (mg/L)</i>	<i>953.8</i>	<i>964.13</i>	<i>0.93%</i>
			<i>968.8</i>		
			<i>969.8</i>		
	<i>3º Día</i>	<i>10 (mg/L)</i>	<i>1363.1</i>	<i>1357.53</i>	<i>0.72%</i>
			<i>1363.2</i>		
			<i>1346.3</i>		
	<i>Promedio</i>			<i>1110.04</i>	<i>2.30%</i>
<i>Coefficiente de variación promedio: 2.58 %</i>					

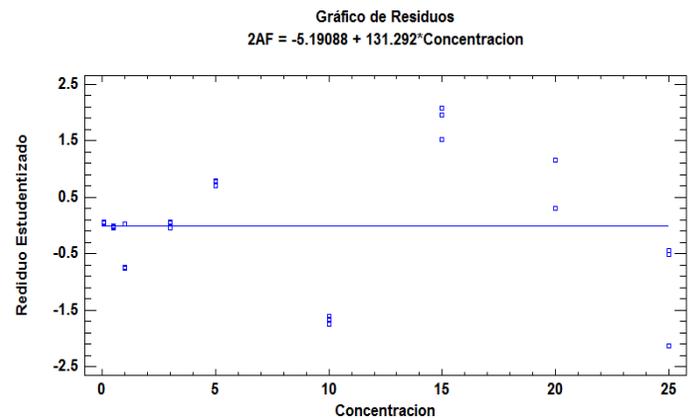
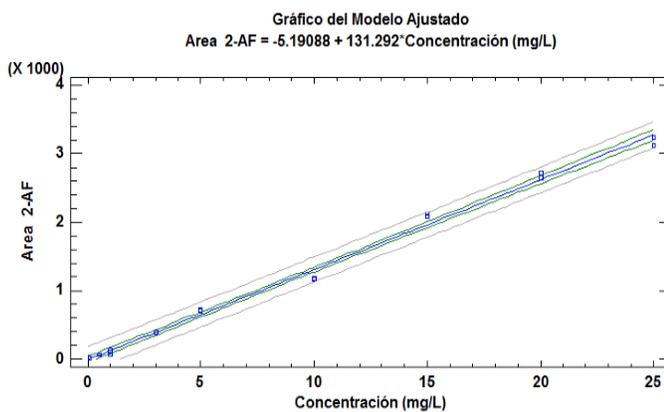
Anexo IX. Curva de linealidad del sistema y residuales para 5-HMF



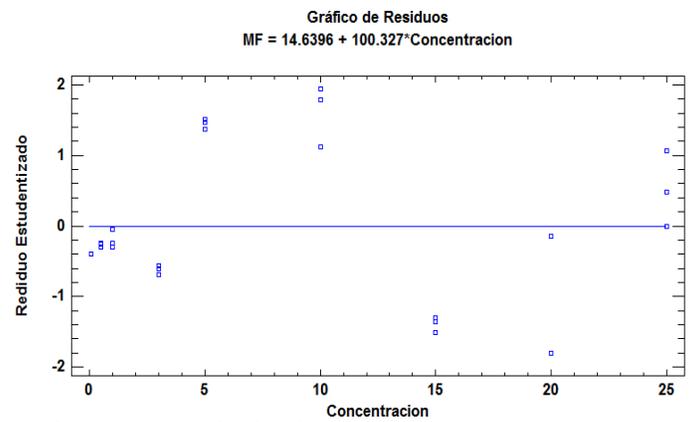
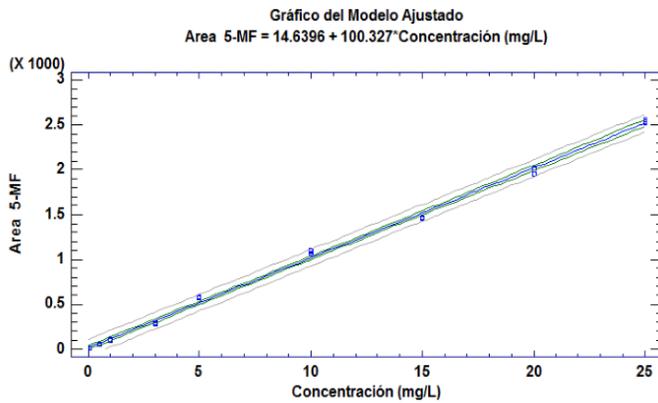
Anexo X. Curva de linealidad del sistema y residuales para FUR



Anexo XI. Curva de linealidad del sistema y residuales para 2-AF

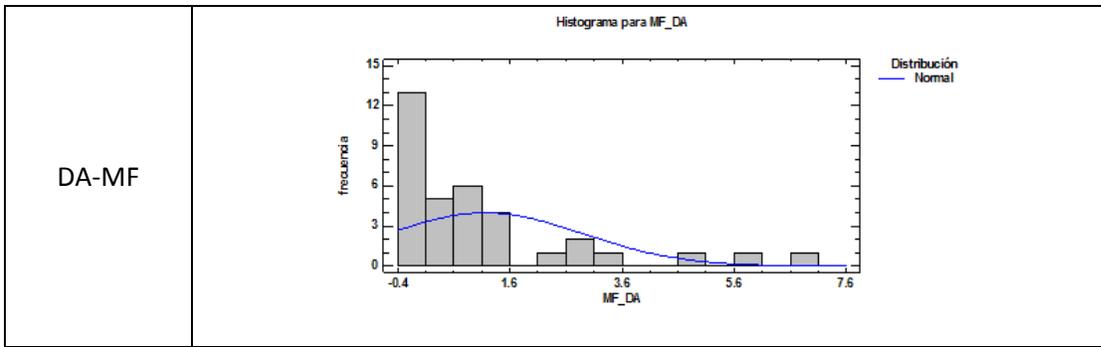


Anexo XII. Curva de linealidad del sistema y residuales para 5-MF

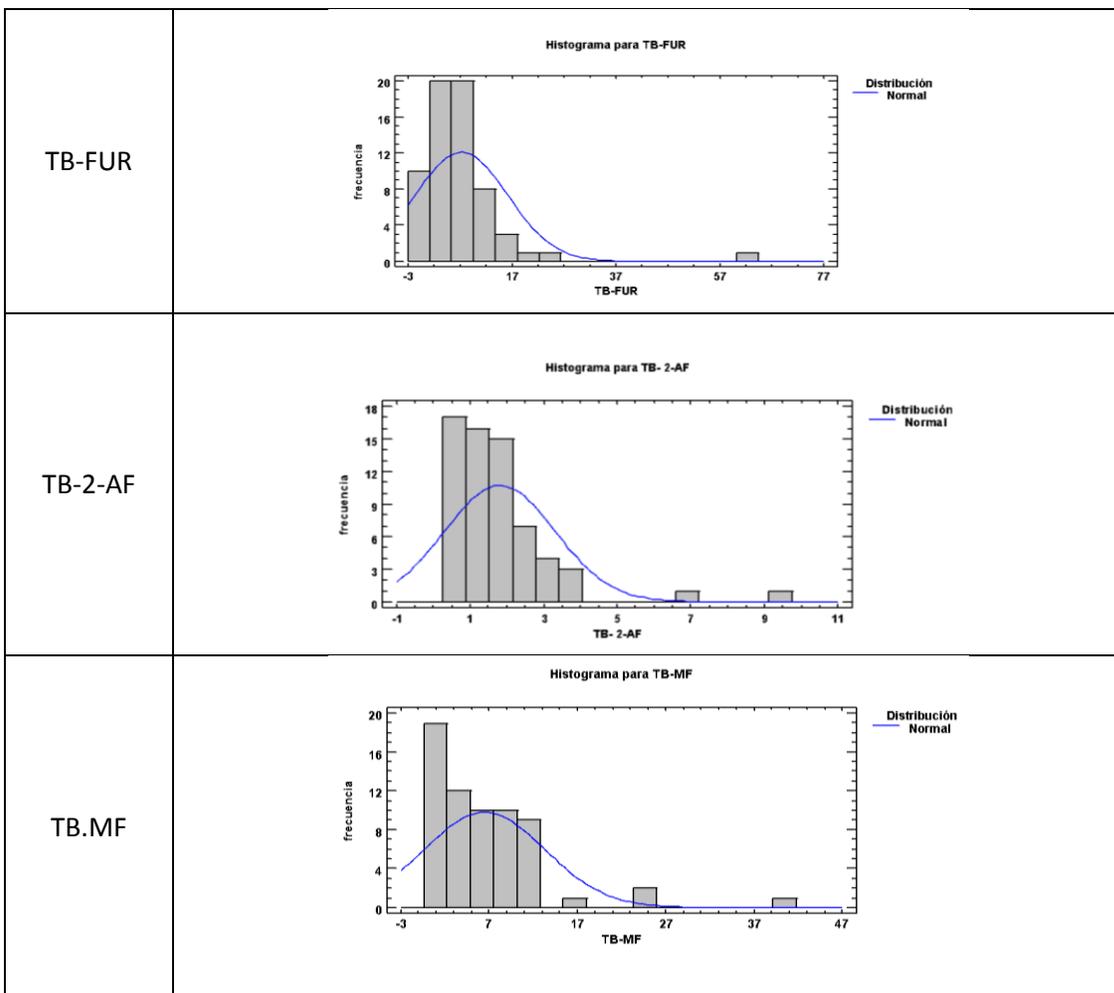


Anexo XIII. Histogramas de prueba de normalidad para Destilado de Agave

ANALITO	HISTOGRAMA
DA-FUR	<p>Histograma para FUR_DA</p>
DA-HMF	<p>Histograma para SHMF_DA</p>
DA-AF	<p>Histograma para AF_DA</p>



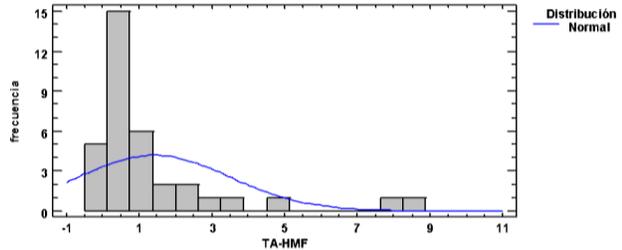
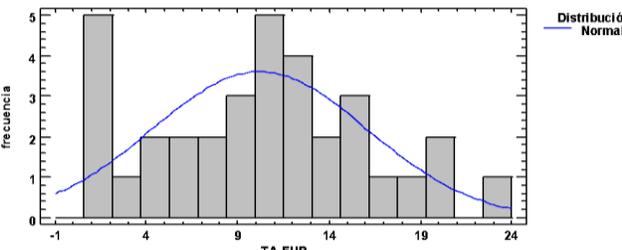
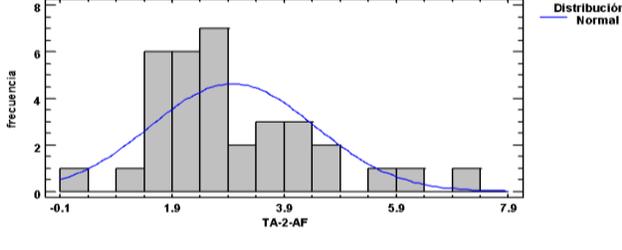
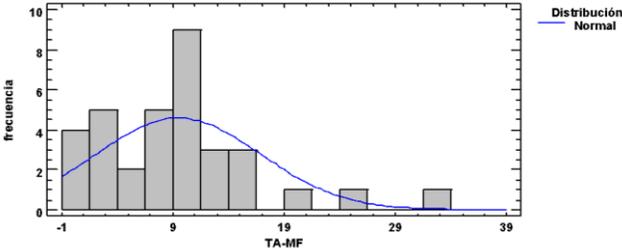
Anexo XIV. Histogramas de prueba de normalidad para Tequila Blanco



Anexo XV. Histogramas de prueba de normalidad para Tequila Reposado

ANALITO	FRECUENCIA
TR-HMF	<p style="text-align: center;">Histograma para TR-HMF</p>
TR-FUR	<p style="text-align: center;">Histograma para TR-FUR</p>
TR-2-AF	<p style="text-align: center;">Histograma para TR-2-AF</p>
TR-MF	<p style="text-align: center;">Histograma para TR-MF</p>

Anexo XVI. Histogramas de prueba de normalidad para Tequila Añejo

ANALITO	FRECUENCIA
TA-HMF	<p style="text-align: center;">Histograma para TA-HMF</p>  <p style="text-align: right;">Distribución Normal</p>
TA-FUR	<p style="text-align: center;">Histograma para TA-FUR</p>  <p style="text-align: right;">Distribución Normal</p>
TA-2-AF	<p style="text-align: center;">Histograma para TA-2-AF</p>  <p style="text-align: right;">Distribución Normal</p>
TA-MF	<p style="text-align: center;">Histograma para TA-MF</p>  <p style="text-align: right;">Distribución Normal</p>